

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Real-Time-PCR basierter Nachweis zirkulierender Tumorzellen (CTCs) aus dem peripheren Blut von  
Brustkrebspatientinnen mit Hilfe von EMT-Markergenen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Kristina Schlenk**  
aus  
**München**  
**2019**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. med Ulrich Andergassen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Eva-Maria Grischke

Prof. Dr. Ralph Mocikat

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin:

Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2019

# Inhalt

1 Einleitung .....	1
1.1 Mammakarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Symptomatik und Diagnostik .....	3
1.1.3 Klassifikation.....	5
1.1.3.1 Stadieneinteilung (Staging) .....	5
1.1.3.2 Grading und histopathologische Klassifikation .....	6
1.1.3.3 Molekulare und immunhistochemische Typisierung .....	8
1.1.4 Therapie und Prognose .....	9
1.1.4.1 Therapie präinvasiver Läsionen.....	9
1.1.4.2 Therapie des invasiven Mammakarzinoms .....	10
1.1.4.3 Prognose des invasiven Mammakarzinoms .....	11
1.1.5 Nachsorge, Rezidive und Metastasierung .....	12
1.2 Mechanismen der Metastasierung .....	14
1.2.1 Modelle der Metastasierung .....	14
1.2.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTC) .....	14
1.2.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	16
1.3 Quantitative Echtzeit-PCR als Arbeitsmethode.....	18
1.4 Markergene .....	21
1.4.1 Zytokeratin 19 (CK19) .....	21
1.4.2 Snail (SNAI1) .....	21
1.4.3 Slug (SNAI2) .....	22
1.4.4 FOXC2 .....	22
1.4.5 Twist .....	22
1.4.6 Akt2 .....	23
1.4.7 ALDH1 .....	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	24
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Verfahren.....	25
2.1.1 Zellisolierung aus EDTA-Vollblut.....	25
2.1.2 Gewinnung von RNA und cDNA .....	26
2.1.2.1 Extraktion der RNA .....	26
2.1.2.2 Messung der Konzentration und Reinheit der RNA .....	27

2.1.2.3 Berechnung der RNA-Menge und Umschreibung in cDNA .....	28
2.1.3 Quantitative Real-Time PCR .....	29
2.1.3.1 Plattenbelegung .....	29
2.1.3.2 Probenvorbereitung und Pipettieren .....	30
2.1.3.3 Auswertung der RT-PCR .....	31
2.2 Zellkulturen.....	33
2.2.1 Zelllinien .....	33
2.2.2 Kultivierung der Zelllinien und Abnahme .....	33
2.2.3 Einfrieren von Zellen .....	34
2.2.4 Auftauen eingefrorener Zellen.....	34
2.2.5 Zellzählung.....	35
2.3 Patientenproben .....	36
2.4 Methodisches Vorgehen .....	40
2.4.1 Spiking-Experimente.....	40
2.4.2 Übertragung auf Patientenproben.....	40
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Ergebnisse der Spiking-Experimente.....	41
3.1.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten RNAs .....	41
3.1.2 Werte der Genexpression aus der RT-PCR.....	43
3.1.2.1 Ergebnisse für CK19.....	45
3.1.2.2 Ergebnisse für Snail .....	47
3.1.2.3 Ergebnisse für Slug .....	48
3.1.2.4 Ergebnisse für FoxC2 .....	49
3.1.2.5 Ergebnisse für Twist .....	50
3.1.2.6 Ergebnisse für Akt 2.....	52
3.1.2.7 Ergebnisse für ALDH 1 .....	52
3.2 Ergebnisse der Patientenproben.....	53
3.2.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten RNAs .....	53
3.2.2 Werte der Genexpression aus der RT-PCR.....	57
3.2.2.1 Genexpression von CK19 .....	61
3.2.2.2 Genexpression von Snail .....	65
3.2.2.3 Genexpression von FoxC2 .....	69
3.2.2.4 Genexpression von Twist.....	73
4 Diskussion .....	77
4.1 Vorversuche: Spiking-Experimente .....	77

4.2 Untersuchung der Patientenproben .....	80
4.3 Ausblick.....	84
5 Zusammenfassung.....	86
6 Anhang.....	IV
6.1 Literaturverzeichnis.....	IV
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	XIII
6.3 Tabellenverzeichnis .....	XV
6.4 Abkürzungsverzeichnis .....	XVI
6.5 Material und Geräte .....	XVIII
6.6 Ethikantrag .....	XXIV
Poster und Veröffentlichung .....	XXV
Eidesstattliche Erklärung.....	XXVI
Danksagung .....	XXVII

# 1 Einleitung

Eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Trotz verbesserter Untersuchungs- und Therapiemethoden, ist diese Entität nach wie vor die häufigste Krebstodesursache in Deutschland.

Die Hauptursache dieser hohen Sterblichkeit bei Brustkrebs ist die Ausbildung von Fernmetastasen im Verlauf der Krankheit. Während des Metastasierungsprozesses verändern einzelne Zellen des Tumors ihre Oberflächen- und Adhäsionseigenschaften und wandern in den Blutkreislauf ein. Diese Zellen werden „zirkulierende Tumorzellen“ (CTCs) und der Veränderungsprozess wird „epithelial-mesenchymale Transition“ (EMT) genannt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden in welchem Ausmaß Markergene der EMT zur Detektion von CTCs im Blut von Brustkrebspatientinnen geeignet sind und inwiefern die Detektion dieser mit einer schlechteren Diagnose der Patientinnen einhergeht. Ein breiteres Spektrum an Markergenen würde die Detektion der CTCs und somit die frühzeitige Diagnose eines Metastasierungsgeschehens erleichtern. Hieraus wiederum würden sich wesentliche Veränderungen für die Therapie und Prognose der Patientinnen ableiten

## 1.1 Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Jahr 2012 erkrankten ca. 1,7 Millionen Menschen weltweit an Brustkrebs (medizinisch: Mammakarzinom). Damit ist Brustkrebs der zweithäufigste Krebs überhaupt und der häufigste Krebs der Frau. Im selben Jahr verstarben 500.000 Menschen an Brustkrebs, was diesen zur fünfthäufigsten Krebstodesursache weltweit macht [1]. Laut dem aktuellsten „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland“ des Robert-Koch-Institutes (RKI) aus dem Jahr 2015 gehört Brustkrebs mit über 72.000 Neuerkrankungen im Jahr 2013 zu den häufigsten Krebsentitäten in Deutschland. Bei Frauen war das Mammakarzinom mit über 71.000 Neuerkrankungen der häufigste Krebs, während Brustkrebs bei Männern mit gerade einmal 699 Neuerkrankungen sehr selten ist. Bei einem Lebenszeitrisko von 12,8% erkrankt eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom [2].

Die neuesten Daten für Todesursachen in Deutschland aus dem Jahr 2014 zeigen, dass bösartige Neubildungen der Brustdrüse mit fast 18.000 Todesfällen die achthäufigste und unter Frauen die vierthäufigste Todesursache in Deutschland waren [3]. Bei der Anzahl der Todesfälle durch Krebserkrankungen lag über beide Geschlechter genommen nur noch Lungen- und Bronchialkrebs vor dem Mammakarzinom. Bei Frauen war das Mammakarzinom sogar die häufigste Krebstodesursache im Jahr 2014 [4], wobei die Sterberaten in den neuen Bundesländern ca. 20% niedriger waren als im Westen [2].

Das Mittlere Erkrankungsalter für Frauen in Deutschland lag 2013 bei ungefähr 64 Jahren. Etwa 45% der Neuerkrankungen traten in der Altersgruppe von 50-69 Jahren und 37% im Alter von über 70 Jahren auf. Das relative 5-Jahres-Überleben für Frauen lag 2013 bei 88% [2].

Bei Brustkrebs handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, für die im Laufe der Jahre, verschiedene Risikofaktoren identifiziert wurden:

**Lebensalter:** Das Brustkrebsrisiko steigt mit zunehmendem Lebensalter. Bis zur Menopause verdoppelt sich das Risiko für ein Mammakarzinom alle 10 Jahre [5]. Im Vergleich zu anderen Krebsarten liegt das mittlere Erkrankungsalter mit knapp 60 Jahren jedoch eher in jüngeren Jahren.

**Veränderte Hormonspiegel:** Endogene Hormonspiegel besitzen ebenfalls einen starken Einfluss auf das Erkrankungsrisiko. Hierbei erhöhen vor allem eine frühe erste und späte letzte Regelblutung, sowie Kinderlosigkeit oder ein hohes Alter bei der ersten Geburt das Mammakarzinom-Risiko [6]. Das Risiko von Frauen, die erst mit über 30 Jahren ihr erstes Kind bekommen, ist dabei doppelt so hoch wie das von Frauen, welche vor dem 20. Lebensjahr Mutter werden [5].

Als weiterer Risikofaktor gelten exogen zugeführte Hormone. Vor allem mehrjährige Hormonersatztherapien mit Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparaten im Rahmen von Wechseljahresbeschwerden erhöhen das Risiko eines Mammakarzinoms um bis zu 26%. Das Risiko steigt hierbei mit der Dauer der Anwendung [7]. Ca. 2,5 Jahre nach Absetzen der Medikation entspricht das Risiko an Brustkrebs zu erkranken wieder dem der restlichen Bevölkerung [8]. Durch Einnahme hormonhaltiger Kontrazeptiva erhöht sich das relative Risiko an Brustkrebs zu erkranken geringfügig auf ca. 1,24. Schon 10 Jahre nach Absetzen der Ovulationshemmer besteht keine wesentliche Risikoerhöhung für Brustkrebs mehr. Auch scheinen Dauer der Einnahme, Alter bei Beginn der Einnahme sowie Dosis und Hormontyp keinen wesentlichen Effekt auf das Mammakarzinom-Risiko zu besitzen [5].

**Lebensstil:** Auch verschiedene lebensstilbezogene Faktoren scheinen das Erkrankungsrisiko zu beeinflussen. Hierbei sind vor allem Übergewicht, mangelnde Bewegung und hoher Alkoholkonsum zu nennen. [2]. Übergewicht verdoppelt beispielsweise bei postmenopausalen Frauen das Risiko für ein Mammakarzinom [5]. Zudem steigt das Risiko für eine Brustkrebserkrankung bei Raucherinnen auf das 1,32-fache gegenüber Frauen, die nie geraucht haben. Hierbei scheint vor allem eine hohe Anzahl von Zigaretten pro Tag das Risiko zu erhöhen [9]. Bei der Ernährung scheint vor allem das Essen von rotem Fleisch relevant zu sein. So steigt das relative Risiko für eine Brustkrebserkrankung bei höherem Gesamt-Fleischkonsum auf 1,22 [10].

**Genetische Erkrankungen:** Genetische Prädisposition wird in etwa 5-10 % der Fälle als Ursache für Brustkrebs gesehen. Möglich ist beispielsweise eine Mutation der Gene BRCA1 und BRCA2, die auf den langen Armen von Chromosom 17 und 13 lokalisiert sind [5]. Das Lebenszeitrisiko für eine Brustkrebserkrankung bei Trägerinnen dieser mutierten Gene beträgt 80-85 % [7]. Andere Genmutationen, wie z.B. p53 und PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog) sind selten, gehen jedoch mit einem hohen Risiko für Brustkrebs einher [5]. Diese genetischen Faktoren sind vor allem für die Nachsorge und das Risikomanagement weiblicher Nachkommen wichtig. Zudem treten bei Trägerinnen dieser Genmutationen gehäuft andere epitheliale Krebsformen (z.B. Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom) auf [5]. Hinweisend auf eine genetische Belastung ist das erhöhte Auftreten von Brustkrebserkrankungen in einer Familie. Als familiär belastet gelten Patientinnen, wenn in einer Linie der Familie [11]:

- mindestens drei Frauen an Brustkrebs erkrankt sind
- mindestens zwei Frauen an Brustkrebs erkrankt sind, davon eine vor dem 51. Lebensjahr
- mindestens eine Frau an Brustkrebs und 1 Frau an Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens zwei Frauen an Eierstockkrebs erkrankt sind
- mindestens eine Frau an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt ist und mindestens eine Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt ist
- mindestens eine Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt ist
- mindestens ein Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt sind

**Bestehende Brustveränderungen:** Vorherige gutartige Veränderungen des Brustgewebes spielen ebenfalls eine Rolle bei der Erhöhung des Brustkrebsrisikos. Während Patientinnen mit tastbaren Zysten, duktalem Papillomen und radiärer Narbe oder komplexen sklerosierenden Läsionen nur ein geringfügig erhöhtes Risiko für eine Erkrankung an Brustkrebs besitzen [5], steigt das Risiko bei Vorhandensein einer atypischen duktalem Hyperplasie auf das drei- bis fünffache innerhalb von 10 Jahren [12].

Es gibt jedoch auch verschiedene protektive Faktoren:

**Reproduktive Faktoren:** Längeres Stillen und mehrfache Geburten senken das relative Risiko für eine Brustkrebserkrankung. In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurde eine Abnahme des relativen Risikos für ein Mammakarzinom von 4,3 % pro 12 Monate Stillzeit und eine zusätzliche Verringerung des Risikos um 7,0 % pro Geburt, ermittelt [13]. Auch ein jüngeres Alter beim Gebären scheint sich – wie oben beschreiben – positiv auszuwirken.

**Lebensstil:** Ein gesunder Lebenswandel mit ausgewogener Ernährung und Bewegung scheint ebenfalls das Krankheitsrisiko zu verringern. Sportliche Betätigung beispielsweise kann das Risiko für Brustkrebs im Durchschnitt um ca. 25 % senken, wobei das vor allem für moderate sportliche Betätigung und über die gesamte Lebenszeit durchgeführte Aktivitäten gilt [14; 15]. Durch angepasste Ernährung ist eine Senkung des Brustkrebsrisikos möglich. Das Mammakarzinom-Risiko sinkt um 17% bei Ersatz einer Mahlzeit mit rotem Fleisch pro Tag durch Geflügel und um 14% bei Ersatz durch eine Mischung von Hülsenfrüchten, Nüssen, Geflügel und Fisch [10].

### **1.1.2 Symptomatik und Diagnostik**

In frühen Stadien verursacht das Mammakarzinom meist keine Schmerzen oder andere Beschwerden, wodurch die Diagnostik der Erkrankung deutlich erschwert wird. Es gibt jedoch bestimmte Anzeichen, die auf eine mögliche Brustkrebserkrankung hindeuten können und daher durch regelmäßige Selbstuntersuchung kontrolliert werden sollten [16]:

**Knoten in der Brust:** Knoten in der Brust sind je nach Lage und Brustdicke erst ab einer Größe von ca. 1-2 cm tastbar. Meist sind die Knoten nicht verschieblich, schmerzlos und fest [16]. Bei Feststellung eines Knotens in der Brust sollte eine Vorstellung beim Arzt erfolgen. Hierbei sind immer der Zeitpunkt des Ertastens, Begleitsymptome wie Schmerzen oder Mamillensekretion und Risikofaktoren für Brustkrebs wichtig [17].

**Mamillenveränderungen:** Veränderungen der Brustwarzen können ebenfalls ein mögliches Symptom bei Brustkrebs sein. Hierbei sind vor allem neu aufgetretene Einziehungen und Einsenkungen der gesamten Brustwarze, Entzündungen oder blutige oder klare, einseitige Mamillensekretion abklärungsbedürftig [16].

**Hautveränderungen:** Hauteinziehungen, wie das Plateau-Phänomen, oder andere Hautveränderungen, wie Großporigkeit oder "Orangenhaut", sind Alarmsignale im Bezug auf Brustkrebs und sollten ebenso wie nicht abklingende Rötungen und Entzündungen eine baldige Untersuchung nach sich ziehen [16].

**Veränderungen in der Achselhöhle:** Tastbare Knoten oder Schwellungen in der Achselhöhle können ein mögliches Anzeichen für Lymphknoten-Metastasen sein. Sollten diese jedoch isoliert auftreten ist der Ausschluss eines Infektes vorrangig [16].



Da es keine eindeutigen Warnzeichen für Brustkrebs gibt, ist die regelmäßige Untersuchung und Diagnostik wichtig, um schon frühe Stadien der Erkrankung entdecken zu können.

Die Basisdiagnostik besteht in einer klinischen Brustuntersuchung mit Inspektion und Palpation der Brust und Lymphabflussgebiete, die ab dem 30. Lebensjahr jährlich durch den Frauenarzt durchgeführt werden sollte. In Deutschland ist zudem seit dem Jahr 2005 das Mammographie-Screening-Programm flächendeckend etabliert worden. Hierbei werden Frauen im Alter von 50 Jahren bis 70 Jahren alle 2 Jahre wohnortnah zur Mammographie eingeladen. Die Mortalität durch Mammakarzinom konnte durch das großflächige Screeningprogramm laut Studien aus den Jahren 2010 und 2011 um 15-30% reduziert werden [18; 19]. Neuere Studien aus dem Jahr 2013 zeigen jedoch keine relevante Reduktion der Mortalität durch ein großflächiges Screening, sondern eine erhöhte Rate an Überdiagnosen und Überbehandlung [20]. Laut Leitlinie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) ist die Mammographie jedoch nach wie vor für die oben genannten Personen empfohlen. Des Weiteren sollte laut Leitlinie die Mammographie nach individueller Abwägung auch bei jüngeren Frauen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko, beispielsweise durch familiäre Belastung, endogene und exogene hormonelle Faktoren sowie histologisch gesicherte präinvasive Neoplasien, durchgeführt werden, um die Früherkennung eines Mammakarzinoms zu ermöglichen [11].

Bei einem erhöhten Risiko durch familiäre Belastung sollte aufgrund des frühen Erkrankungsalters der Untersuchungsalgorithmus angepasst werden. Die Früherkennungsmaßnahmen sollten in diesem Fall eine halbjährliche Tastuntersuchung und Sonographie ab dem 25. Lebensjahr, sowie eine jährliche MRT-Untersuchung ab dem 25. und Mammographie ab dem 30. Lebensjahr umfassen [11].

Die klinische Untersuchung und Bildgebung bei Patientinnen mit frühem Mammakarzinom ermöglicht eine frühzeitige Erfassung des Ausbreitungsmusters und eine adäquate Therapie. Ergibt sich bei der klinischen Untersuchung in der Basisdiagnostik ein auffälliger Befund, sollte dieser durch bildgebende Verfahren weiter untersucht werden. Hierbei ist bei Frauen unter 40 Jahren und Frauen mit hoher Brustdicke die Sonographie das Mittel der Wahl, wohingegen bei älteren Frauen die Mammographie bevorzugt werden sollte [11]. Eine kontrastmittel-gestützte MRT-Untersuchung kann die Ausbreitungsdiagnostik bei erschwerten Bedingungen (z.B. bei Verdacht auf Multizentrität, Frauen mit Brustimplantaten oder Frauen mit hohem genetischen Mammakarzinomrisiko) erleichtern [11].

Zur histologischen Abklärung der in der Bildgebung auffälligen Brustbefunde sind bildgebend überwachte Stanz- und Vakuumbiopsien von Nöten. Diese invasiven Methoden ermöglichen die prätherapeutische Bestimmung therapierelevanter tumormorphologischer Faktoren, wie Tumortyp, Grading und Hormonrezeptorstatus. Offene Exzisionsbiopsien zur histologischen Tumorbestimmung sollten nur durchgeführt werden, wenn perkutane Biopsien nicht möglich sind. Für eine optimale Therapieplanung ist zudem die Bestimmung des Lymphknotenstatus notwendig. Die Sonographie axillärer Lymphknoten zeigt hierbei eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität, wobei die Spezifität in Kombination mit einer Biopsie nahezu 100% erreicht. Unauffällige Biopsiebefunde schließen jedoch eine Metastasierung im Bereich der axillären Lymphknoten nicht aus [21]. Der definitive Lymphknotenstatus sollte daher durch eine Sentinel-Biopsie geklärt werden, bei der der sogenannte Wächterlymphknoten (Sentinel-Lymphknoten, SLN) mittels Farbstoff- oder Radionuklidfärbung markiert und dann entnommen wird [11].

### 1.1.3 Klassifikation

#### 1.1.3.1 Stadieneinteilung (Staging)

Vor Beginn der Therapie ist es beim sogenannten Staging notwendig, den Tumor hinsichtlich seiner Ausbreitung zu untersuchen, da diese einen großen Einfluss auf die Therapieplanung und -möglichkeiten hat. Teilweise werden die hierfür notwendigen Untersuchungen bereits in der Basisdiagnostik durchgeführt (vgl. 1.2), zum Teil ist eine endgültige Klassifikation jedoch nur durch operatives Vorgehen möglich. Die Beschreibung der Tumorausbreitung erfolgt über das TNM-System der UICC (Union internationale contre le cancer), das folgende Kriterien umfasst [22]:

**T** = Ausdehnung des Primärtumors

**N** = Vorhandensein/Fehlen regionärer Lymphknotenmetastasen

**M** = Vorhandensein/Fehlen von Fernmetastasen

TNM-Werte vor einer Gewebeuntersuchung werden mit einem kleinen "c" ergänzt (für englisch "clinical"). Ist die pathologische Untersuchung erfolgt, wird dagegen ein kleines "p" vor die TNM-Angaben gesetzt. Die pTNM-Klassifikation gilt hierbei als zuverlässiger [22].

Vor Beginn der Therapie sollten alle Patientinnen gemäß dem TNM-System vollständig klassifiziert werden. Hierbei ist eine Mammographie (auch der Gegenseite) obligat. Zudem wird bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen oder Verdacht auf Metastasierung ein prätherapeutisches Staging mit Röntgen Thorax-Untersuchung, Lebersonographie und Skelettszintigraphie empfohlen [11].

Tabelle 1 beschreibt die seit 2010 gültige TNM-Einteilung der UICC [11]:

<b>TNM</b>	
<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ (DCIS, LCIS)
<b>T1</b>	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser T1mic    Mikroinvasion $\leq 0,1$ cm im größten Durchmesser T1a $> 0,1$ cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser T1b $> 0,5$ cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser T1c $> 1$ cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
<b>T2</b>	$> 2$ cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
<b>T3</b>	$> 5$ cm im größten Durchmesser
<b>T4</b>	Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut T4a      Befall der Thoraxwand (jedoch nicht der Pektoralismuskulatur) T4b      Ödem, Ulzeration oder Satellitenknoten der Haut in gleicher Brust T4c      Vorliegen von T4a und T4b T4d      Inflammatorisches Karzinom
<b>Nx</b>	Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten (LK) möglich
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastasen in 1–3 ipsilat. LK und/oder mikroskopische Metastasen in SLN entlang der ipsilat. A. mammaria interna (AMI) N1mi    Mikrometastasen ( $> 0,2$ mm und/oder $> 200$ Tumorzellen, aber $< 0,2$ cm)

	N1a	1–3 axilläre LK-Metastasen, darunter mindestens eine > 2 mm
	N1b	N1mi in SLN entlang der AMI, klinisch nicht erkennbar
	N1c	N1a und N1b
<b>N2</b>	N2a	Metastasen in 4–9 axillären LK, darunter mindestens eine > 2 mm
	N2b	Metastasen in klinisch erkennbaren LK entlang AMI ohne axilläre LK-Metastasen
<b>N3</b>	Metastasen wie nachfolgend beschrieben:	
	N3a	Metastasen in ≥10 ipsilat. axillären LK oder in ipsilat. infraklavikulären LK
	N3b	Metastasen in LK entlang AMI mit mind.1 axillären LK-Metastase o. LK-Metastasen in > 2 axillären LK und in SLN entlang AMI, aber nicht klinisch erkennbar
	pN3c	Metastasen in ipsilat. supraklavikulären LK
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen nachweisbar	
<b>M1</b>	Fernmetastasen nachweisbar	

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC** mit Einteilung der verschiedenen T-, N-, und M-Stadien [11]

Mit der vollständigen TNM-Klassifikation ist die Einteilung in die UICC-Stadien gemäß Tabelle 2 möglich, welche eine wichtige Rolle für die Therapieentscheidung spielt [11]:

		<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Stadium 0</b>		Tis	N0	M0
<b>Stadium I</b>	A	T1mic, T1	N0	M0
	B	T0, T1mic, T1	N1mi	M0
<b>Stadium II</b>	A	T0, T1mic, T1	N1	M0
		T2	N0	M0
	B	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
<b>Stadium III</b>	A	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0
		T3	N1, N2	M0
	B	T4	N0, N1, N2	M0
	C	Alle T	N3	M0
<b>Stadium IV</b>		Alle T	Alle N	M1

**Tabelle 2: UICC Stadien des Mammakarzinoms** [11]

### 1.1.3.2 Grading und histopathologische Klassifikation

Zur Bestimmung der Prognose ist zudem das sogenannte „Grading“ notwendig. Dieses gibt den Differenzierungsgrad des Tumors an, also wie sehr sich das untersuchte Tumorgewebe vom Ursprungsgewebe unterscheidet [22]. Hierbei werden die Mitoserate, Tubulusbildung und Kernpolymorphie gemäß Elston und Ellis mit Scores von 1 bis 3 bewertet. Aus dem Summenscore ergibt sich dann das Grading [11]:

- **G1:** gut differenziertes Tumorgewebe = geringer Malignitätsgrad (Summenscore 3 bis 5)
- **G2:** mäßig differenziertes Tumorgewebe = mäßiger Malignitätsgrad (Summenscore 6 und 7)
- **G3:** schlecht differenziertes Tumorgewebe = hoher Malignitätsgrad (Summenscore 8 und 9)

Zur Diagnosesicherung ist zudem die histopathologische Klassifikation des Tumors notwendig. Die Klassifikation erfolgt meist an Vakuum- oder Stanzbiopsien, für deren standardisierte Befundung von der European Working Group for Breast Screening Pathology (EWGBSP) die B-Klassifikation eingeführt wurde [11; 23]:

- B1: Nicht verwertbar oder ausschließlich Normalgewebe
- B2: Benigne (z.B. fibrös-zystische Mastopathie, Fibroadenom)
- B3: Benigne, aber mit unsicherem biologischem Potential (z.B. atypische duktale Hyperplasie, lobuläre Neoplasie)
- B4: Malignitätsverdächtig
- B5: Maligne
  - a) in-situ Karzinom
  - b) invasives Karzinom
  - c) unsicher ob in-situ oder invasiv
  - d) andere Malignome außer Mammakarzinom (Metastasen, Sarkome)

Als präinvasive Neoplasien mit erhöhtem Risiko für ein Mammakarzinom gelten hierbei die lobulären Neoplasien (LN), die atypischen dukталen Hyperplasien (ADH) und das duktale Carcinoma in situ (DCIS). Die lobulären Neoplasien beinhalten hierbei das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) und die atypische lobuläre Hyperplasie (ALH). Die Besonderheiten der LN sind vor allem das multizentrische und bilaterale Auftreten, sowie die Erhöhung des Erkrankungsrisikos für ein Mammakarzinom um den Faktor 7-12. Zur Unterscheidung von einem Low-Grade DCIS kann der Nachweis von E-Cadherin nützlich sein, das von einem DCIS exprimiert wird, jedoch nicht von den LN. Es wird zudem je nach Atypie in die Differenzierungsgrade LIN1-3 unterteilt [11]. Die niedriggradigen Kategorien LIN1 und LIN2 werden meist noch der Kategorie B3 zugeordnet, wohingegen Läsionen der Kategorie LIN3 oder mit Nekrosen oder Siegelringzellen der Kategorie B5a zuzuordnen sind [23].

Die ADH gilt als potenzielle jedoch nicht gesicherte Vorläuferläsion und erhöht das Mammakarzinomrisiko um das vier- bis fünffache.

Das duktale Carcinoma in situ gilt als Präkanzerose und hat je nach Kerngrading, Größe und Verteilungsmuster ein hohes Risiko für ein sekundäres Mammakarzinom, wächst allerdings nicht invasiv. Es tritt meist unizentrisch auf, zeigt jedoch ein multifokales, diskontinuierliches Wachstumsmuster. Ähnlich der invasiven Karzinome wird es ebenfalls nach WHO in ein low grade, intermediate grade und high grade DCIS unterteilt. Das Grading ist hierbei abhängig von Zytologie/Kerngrad, Nekrosen, Kalzifikationen und Architektur des DCIS [11]. Aufgrund seiner Assoziation mit Kalzifikationen wird das DCIS in den letzten Jahren immer häufiger im Rahmen des Mammographie-Screenings diagnostiziert. Eine Sonderform des DCIS ist der Morbus Paget der Mamille, der ein intraepidermales DCIS darstellt und sich klinisch in einer ekzemartigen Hautveränderung manifestiert. Das assoziierte DCIS ist meist hochgradig und weist häufig eine Amplifikation des „human epidermal growth factor receptor 2“ (HER2/neu, c-erbB2) – eines epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors – auf [23].

Die in der Kategorie B5 enthaltenen invasiven Karzinome sind gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation in 37 verschiedene Typen einzuordnen [11], von denen hier die häufigsten genannt sind:

- Invasive carcinoma of no special type (NST, vormaliges invasives duktales Karzinom), bestehend aus
  - Gemischter Typ
  - Pleomorphes Karzinom
  - Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
  - Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen
  - Karzinom mit melanotischen Merkmalen
- Invasives lobuläres Karzinom

- Inflammatorisches Karzinom
- Weitere u.a.
  - Tubuläres Karzinom
  - Invasives kribriiformes Karzinom
  - Medulläres Karzinom
  - Muzinöses Karzinom

Hierbei ist das NST mit ca. 75 % der bei weitem häufigste Tumortyp. Es ist eine heterogene Gruppe, bei der die Tumore nicht eindeutig einem histologischen Typ zugeordnet werden können. Mehr als 50 % der Tumormasse weisen ein nicht spezialisiertes Muster auf. Die Prognose dieses Types entspricht in etwa der der Gesamtgruppe der Mammakarzinome oder ist nur leicht schlechter. 70-80 % der Tumore exprimieren Steroidhormonrezeptoren und 15-25 % zeigen eine Amplifikation von HER2 [11]. Der zweithäufigste Tumortyp ist mit 5-15% der invasiven Mammakarzinome das invasiv lobuläre Karzinom, das von den Drüsenlappen ausgeht. Seine Prognose entspricht stadienangepasst in etwa dem des NST. Eine Ausbildung von Steroidhormonrezeptoren ist bei diesem Tumortyp häufig, wohingegen eine HER2-Überexpression eher selten vorkommt [11].

Die weiteren Karzinomtypen sind mit ca. 2% Auftretenswahrscheinlichkeit eher selten und haben meist eine recht gute Prognose [11]. Eine Sonderstellung nimmt das inflammatorische Mammakarzinom ein, das klinisch durch eine diffuse Hautrötung und histopathologisch durch eine disseminierte dermale Lymphangiosis carcinomatosa und ein diffus infiltrierendes Karzinom gekennzeichnet ist. Es besitzt eine besonders ungünstige Prognose, da es meist mit einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium einhergeht [24].

### **1.1.3.3 Molekulare und immunhistochemische Typisierung**

Auf Grundlage von Genexpressionsanalysen wurden unterschiedliche molekulare Subtypen des Mammakarzinoms identifiziert. Diese Subtypen sind hinsichtlich ihres Therapieansprechens und ihrer Prognose sehr verschieden und sollten daher schon an Vakuum- oder Stanzbiopsaten untersucht werden. Da im klinischen Alltag die Analyse der Genexpression zu zeit- und kostenaufwändig wäre, wird derzeit eine alternative Klassifikation anhand der Immunhistochemie verwendet, die die Genexpression mit akzeptabler Übereinstimmung abbildet [23].

Dabei wird unter anderem der Hormonrezeptorstatus, also das Vorliegen eines Östrogen (ER)- und/oder Progesteronrezeptors (PR) im Tumor, bewertet. Hierbei wird jeweils der Prozentsatz (0-100%) der Zellkerne mit positiver Färbereaktion, sowie die durchschnittliche Färbeintensität angegeben werden. Als ER- bzw. PR-positiv ist ein Tumor zu bewerten, wenn mindestens 1% der Tumorzellkerne positiv erscheint. Als Ergänzung kann noch der Allred-Score oder der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegener angegeben werden [11].

Desweiteren wird die Expression von HER2 getestet, welche relevant für die Auswahl der Therapie ist. Als HER2-positiv gilt ein Tumor, wenn der Immunhistochemie (IHC)-Score bei 3+ liegt und damit eine gleichmäßige zirkuläre Membranreaktion in mehr als 30 % der Tumorzellen anzeigt. Bei einem IHC-Score von 2+, also einer schwachen zirkulären Membranreaktion oder einer Membranreaktion in weniger als 30 % der Zellen, sollte das Ergebnis mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) als positiv oder negativ bestätigt werden. Als HER2-negativ gilt demnach ein Tumor mit IHC-Score 0 oder 1+, also mit keiner oder einer schwachen, inkompletten Membranreaktion [11].

Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das als Marker zur Darstellung sich teilender Zellen verwendet werden kann. In der Mitose ist es verstärkt durch Anlagerung an die Chromosomen immunhistochemisch anfärbbar und zeigt somit den Anteil teilungsaktiver Zellen in einem Gewebe an [25]. Aufgrund der Korrelation des Ki-67-Proliferationsindex mit den Mitosezahlen eines Tumors, kann es vor allem beim histologischen Grading sehr nützlich sein. Gerade bei ER-/PR-positiven Tumoren wird die Entscheidung ob eine Chemotherapie verwendet werden sollte oder nicht, vom Ki-67-Proliferationsindex abhängig gemacht. Derzeit ist jedoch der prognostische und prädiktive Nutzen des Ki-67 aufgrund des Fehlens eines eindeutigen Grenzwertes noch nicht belegt und wird daher nur im Rahmen von Studien für die Therapieentscheidung empfohlen [11].

Die intrinsischen Subtypen, welche in keiner eindeutigen Beziehung zu den 37 histologischen Subtypen der WHO stehen [23], gliedern sich wie in Tabelle 3 beschrieben [11]:

	<b>Östrogenrezeptor (ER)</b>	<b>Progesteronrezeptor (PR)</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki-67</b>
<b>Luminal A</b>	Positiv	Positiv	Negativ	<14%
<b>Luminal B (HER2-negativ)</b>	Positiv	Positiv	Negativ	≥14%
<b>Luminal B (HER2-Positiv)</b>	Positiv	Positiv	Positiv	Alles
<b>HER2</b>	Negativ	Negativ	Positiv	
<b>Triple negative (basal like)</b>	Negativ	Negativ	Negativ	

**Tabelle 3: Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms** molekulargenetisch klassifiziert anhand der Expression des Östrogenrezeptors, Progesteronrezeptors, des HER2-neu und von Ki-67 [11]

#### **1.1.4 Therapie und Prognose**

Im Folgenden sollen die Therapie und Prognose sowohl der präinvasiven Läsionen, als auch der invasiven Karzinome der Brust dargestellt werden. Die Therapieempfehlungen beziehen sich hierbei auf die aktuelle „Interdisziplinäre S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ der AWMF aus dem Jahr 2012 (entsprechend der Kapitel 4.3, 4.4, 4.6 und 4.7) [11].

##### **1.1.4.1 Therapie präinvasiver Läsionen**

Wird in einer Biopsie eine LIN entdeckt, so sollte diese nur exzidiert werden, falls eine weitere Läsion mit OP-Indikation vorliegt, die Läsion histologisch nicht eindeutig zuzuordnen ist oder eine LIN3 vorliegt. Aufgrund des erhöhten Karzinomrisikos sollte nach einer solchen Exzision ein angemessenes Follow-Up durchgeführt werden. Sollte in dem Exzidat eine LIN 1-2 nachgewiesen werden, so ist keine weitere Resektion erforderlich. Bei Nachweis einer LIN3 in großer Nähe zum Resektionsrand sollte eine Nachoperation erfolgen. Eine adjuvante Strahlentherapie oder adjuvante Chemotherapie ist für Patientinnen mit einer LIN nicht empfohlen [11].

Der Nachweis einer ADH in einer Biopsie ist Indikation für eine offene diagnostische Exzision. Häufig wird in diesen Fällen ein DCIS gefunden. Bei ADH Nachweis im Operationspräparat sollte eine Nachresektion erfolgen, falls die ADH nahe am Resektionsrand liegt und einen Grenzbefund zum DCIS darstellt. Auch für diese Patientinnen ist eine adjuvante Radiatio oder medikamentöse Therapie nicht empfohlen [11].

Bei einem Nachweis eines DCIS in der Biopsie ist die operative Entfernung empfohlen. Die Wahl der Operationstechnik hängt hierbei von der Größe des DCIS und der Möglichkeit zur Einhaltung der

Resektionsränder ab. Zumeist sollte das DCIS jedoch brusterhaltend unter Einhaltung eines Resektionsrandes von 2 mm operiert werden. Eine adjuvante perkutane Radiatio ist bei DCIS nach R0-Resektion bei brusterhaltender Operation oder bei R1-Resektion und fehlender Möglichkeit zur Nachresektion nach Mastektomie indiziert. Bei Bestrahlung nach BET wird das Risiko für ein Lokalrezidiv gesenkt, es zeigt sich jedoch kein Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die Gabe von Tamoxifen kann das Rezidivrisiko senken, zeigt allerdings auch verstärkt Nebenwirkungen und sollte daher individuell entschieden werden. Für den Einsatz von Aromataseinhibitoren gibt es beim DCIS keine Empfehlung [11].

#### **1.1.4.2 Therapie des invasiven Mammakarzinoms**

Die Therapie beim invasiven Mammakarzinom lässt sich grob in drei Therapieformen unterteilen, die einander ergänzen:

**Operative Therapie:** Basistherapie des nicht fortgeschrittenen invasiven Mammakarzinoms ist die operative Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe (R0-Resektion). Der Sicherheitsabstand zum Resektionsrand sollte hierbei mindestens 1 mm betragen. Die brusterhaltende Therapie (BET) ist mit nachfolgender Bestrahlung der Mastektomie bezüglich des Überlebens gleichwertig. Indikationen zur BET sind lokal begrenzte nichtinvasive Karzinome (DCIS), invasive Karzinome mit günstiger Relation von Tumorgroße zu Brustvolumen und invasive Karzinome mit Resektionsrändern im Gesunden. Ist eine BET nicht möglich oder nicht gewünscht, sollte das Karzinom mittels modifizierter radikaler Mastektomie (MRM) operiert werden. Bei dieser Operationsform wird das gesamte Brustdrüsengewebe, die Haut, der Mamillen-Areola-Komplex und die Pektoralisfaszie unter Erhalt der Pektoralismuskulatur entfernt. Notwendig ist eine MRM unter anderem bei Multizentrität, inkompletter Tumorresektion, inflammatorischem Mammakarzinom, Kontraindikation zur adjuvanten Radiatio bei BET oder Wunsch der Patientin. Bei Entfernung großer Brustanteile oder einer radikalen Mastektomie, sollte die Patientin zudem auf jeden Fall über die Möglichkeiten eines Brustwiederaufbaus mittels Prothese oder Eigengewebe hingewiesen werden. Im Rahmen der Operation sollte zudem eine Bestimmung des histologischen Lymphknotenstatus mittels Sentinel-Lymphknotenentfernung (SLNB) durchgeführt werden. Bei fehlender Detektion eines Sentinel-Lymphknotens oder einer positiven SLNB, sollte anschließend eine Axilladisektion mit Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten durchgeführt werden, um den pN-Status zu klären [11].

**Medikamentöse Therapie:** Grundlegend besteht die medikamentöse Therapie des Mammakarzinoms aus Chemotherapie, endokriner Therapie oder Anti-HER2-Antikörper-Therapie oder einer Kombination dieser drei Formen. Mit Hilfe dieser Therapien ist es möglich, die 15-Jahres-Mortalitätsrate um bis zu 30% zu senken. Wichtig ist allerdings eine optimale supportive Begleittherapie (z.B. Antiemesis) und umfassende Aufklärung über Nebenwirkungen und Spätfolgen der Therapien [11].

Als Indikationen für die adjuvante Chemotherapie gelten:

- HER2-positive Tumoren mit simultaner Anti-HER2-Therapie über 1 Jahr
- Endokrin nicht sensitive (ER/PR negativ) und fraglich sensitive Tumore
- Nodal-positive Tumore
- G3
- Junges Erkrankungsalter (<35 Jahre)

Die Standardchemotherapie sollte möglichst ein Taxan enthalten und dauert bei einer anthrazyklin- und taxanhaltigen Therapie ca. 18-24 Wochen [11].

Bei östrogen- oder progesteronsensitiven Tumoren sollte nach Abschluss der Chemotherapie eine endokrine Therapie angewandt werden. Bei prämenopausalen Frauen ist hierbei der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen für 5 Jahre bzw. bis zum Rezidiv Therapie der Wahl. Bei Postmenopausalen Frauen hingegen sind Aromatasehemmer der dritten Generation, wie beispielsweise Letrozol, aufgrund des längeren krankheitsfreien Überlebens vorzuziehen [11].

HER2-positive Patientinnen sollten eine Therapie mit dem Anti-HER2-Antikörper Trastuzumab über ein Jahr erhalten, welche am besten zeitgleich zur Taxan-Phase der Chemotherapie begonnen werden sollte. Eine solche Therapie ermöglicht die Senkung des Risikos für ein Rezidiv um bis zu 50% und die Senkung der Mortalität um ca. 30% [11].

Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen sowie dem inflammatorischen Mammakarzinom sollte eine neoadjuvante systemische Therapie durchgeführt werden. Eine vor der Operation durchgeführte Chemotherapie kann vor allem bei hormonrezeptornegativen Tumoren häufig eine BET ermöglichen. Bei HER2-Positivität sollte die Chemotherapie zudem Trastuzumab enthalten. Bei postmenopausalen Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren, bei denen eine Operation nicht durchführbar ist oder abgelehnt wird, kann eine Therapie mit Aromatasehemmern dritter Generation durchgeführt und eventuell nach dieser Therapie eine Operation durchgeführt werden [11].

**Strahlentherapie:** Nach BET sollte immer eine Bestrahlung des verbliebenen Brustgewebes und der Thoraxwand mit einer Dosis von 50 Gy und einem Boost auf das Tumorbett von 10 Gy durchgeführt werden. Durch die Radiatio kann eine Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle und der erkrankungsspezifischen Mortalität um bis zu 8,5% nach 15 Jahren bewirkt werden. Eine postoperative Radiatio ist nach MRM indiziert bei T3/T4-Tumoren, R1-Resektion und fehlender Möglichkeit zur Nachresektion und Befall von mehr als drei axillären Lymphknoten. Die Bestrahlung wird hierbei analog zur Bestrahlung nach BET durchgeführt. Die Bestrahlung sollte zeitnah nach der Chemotherapie und Operation, sowie je nach Risikofaktoren parallel zur endokrinen Therapie durchgeführt werden. Bei primär inoperablen Tumoren und inflammatorischen Karzinomen sollte die Strahlentherapie nur verwendet werden, falls durch die Systemtherapie keine Operabilität erzielt werden kann [11].

#### **1.1.4.3 Prognose des invasiven Mammakarzinoms**

Anhand der folgenden Eigenschaften des Tumors und Daten der Patientinnen, kann eine Einschätzung des Erkrankungsverlaufes (Prognose) erfolgen:

- pTNM-Status
- Resektionsgrad und Sicherheitsabstände
- Histologischer Typ
- Grading
- Lymphgefäß- und Blutgefäßeinbruch
- Alter

Zur Einschätzung des Erkrankungsverlaufs kann zudem mit Hilfe des Gratings, der Tumorgöße und des Lymphknotenstatus der Nottingham-Prognoseindex erhoben werden, der eine grobe Einschätzung der 15-Jahres-Überlebensrate ermöglicht [11].



Merkmal	Kriterium	Scorewert
<b>Grading</b>	G1	1
	G2	2
	G3	3
<b>Lymphknotenstatus</b>	pN0	1
	1-3 LK positiv	2
	≥ 4 LK positiv	3
Indexwert= Größe (in cm) x 0,2 + Scorewert Grading + Scorewert Lymphknotenstatus		
Indexwert	Prognose	15-Jahres-Überlebensrate
≤ 3,4	Gut	80%
3,41-5,40	Intermediär	42%
> 5,41	Schlecht	13%

**Tabelle 4: Berechnung des Nottingham-Prognose-Index** anhand von Größe, Grading und Lymphknotenstatus, sowie der Interpretation anhand des errechneten Indexwertes [11]

### **1.1.5 Nachsorge, Rezidive und Metastasierung**

Nach der abgeschlossenen lokoregionären Therapie folgt für die nächsten fünf bis zehn Jahre die Nachsorge. Ziel der Nachsorge ist die Früherkennung von Lokalrezidiven, Diagnostik und Therapie von Folgen oder Nebenwirkung der vorangegangenen Behandlung und die Erkennung und Diagnose von Fernmetastasen [11]. Im Rahmen der Nachsorge sollte eine monatliche Selbstuntersuchung der Brust durch die Patientin durchgeführt werden. Die klinische Nachsorge – bestehend aus Anamnese, klinischer Untersuchung und Beratung – sollte in den ersten drei Jahren alle drei Monate, dann alle sechs Monate und ab dem sechsten Folgejahr alle 12 Monate durchgeführt werden. Mammographische und sonographische Nachsorgeuntersuchungen sollten in den ersten drei Jahren des Follow-Ups bei brusterhaltender Therapie (BET) auf der ipsilateralen Seite alle sechs Monate und auf der kontralateralen Seite alle 12 Monate durchgeführt werden. Ab dem vierten Jahr des Follow-Ups nach BET sind Sonographie und Mammographie nur noch jährlich beidseits durchzuführen. Bei Mastektomie erfolgt ab dem ersten Jahr eine jährliche Mammographie der kontralateralen Brust zur Früherkennung. Weiterführende bildgebende Diagnostik und Laborkontrollen sind im Rahmen der Nachsorge nur bei Symptomatik oder dem Verdacht auf ein Rezidiv oder Metastasen indiziert [26].

Als Lokalrezidiv ist ein Wiederauftreten des Tumors in der ipsilateralen Brust oder Thoraxwand definiert. Nach BET und Bestrahlung liegt die Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten eines solchen Rezidives innerhalb der nächsten 10 Jahre bei 5-10 % und geht mit einem durchschnittlichen Fünf-Jahres-Überleben von 65 % einher. Nach Mastektomie liegt die Wahrscheinlichkeit für ein Lokalrezidiv der Thoraxwand bei ca. 4 % verbunden mit einem medianen Fünf-Jahres-Überleben von 50 %. Zusätzlich gehen 25-55 % dieser lokoregionären Rezidive mit einer Fernmetastasierung einher, was ihre Prognose wesentlich verschlechtert. Als prognostische Faktoren für das Auftreten eines lokoregionären Reszidivs gelten hierbei [11]:

- Anzahl der befallenen Lymphknoten
- Tumorgöße (maximaler Durchmesser)
- Grading
- Hormonrezeptorstatus
- Resektionsstatus (R0 vs. ≥R1)

- Fokalität (unifokal vs. multifokal)

Die Therapie eines solchen Rezidivs erfolgt vor allem über operative Intervention, wie zum Beispiel eine sekundäre Mastektomie, und eine nachfolgende Bestrahlung des Gebietes. Eine systemische Therapie zur Verhinderung der Fernmetastasierung kann erwogen werden [24].

Das Mammakarzinom metastasiert sehr früh, wodurch bei ca. drei von hundert Frauen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine fortgeschrittene Erkrankung mit Fernmetastasen vorliegt und langfristig ca. 25 % der Patientinnen von Metastasen betroffen sind [27]. Eine günstigere Prognose haben Patientinnen mit:

- Solitär auftretende und lediglich Knochen oder Haut betreffenden Fernmetastasen
- Positivem Hormonrezeptorstatus
- Niedrigem Grading
- Negativem HER2-Status
- Rezidivfreiem Überleben > 2 Jahre [11].

Bevorzugte Lokalisationen sind Knochen (50-85 % der Metastasen), Lunge und Pleura (60 % der Metastasen), Leber (40-50 % der Metastasen), ZNS und Meningeosis carcinomatosa (15-20 % der Metastasen) und Haut und Weichteile. Da in diesen Fällen eine Langzeitheilung nur in Einzelfällen möglich ist, liegt der Schwerpunkt der Behandlung vor allem auf dem Erhalt von Lebensqualität und Symptombefreiheit. Sie erfolgt daher krankheitsadaptiert und individualisiert [24].

## 1.2 Mechanismen der Metastasierung

Metastasierung ist die häufigste Todesursache im Rahmen von Krebserkrankungen [28]. Werden bei einer Untersuchung Fernmetastasen festgestellt, gilt der Tumor nur noch in den seltensten Fällen als heilbar [29]. Im Folgenden sollen einige Mechanismen erörtert werden, die zur Metastasierung eines Mammakarzinoms beitragen können.

### 1.2.1 Modelle der Metastasierung

Um die Vorgänge im Rahmen einer Metastasierung zu beschreiben, gibt es zwei verschiedene Modellsysteme.

**Das Modell der linearen Progression:** Bei diesem Modell korreliert die Metastasierungsrate mit der Größe des Tumors. Im Rahmen dieses Modells wird davon ausgegangen, dass die Zellen einen Selektionsmechanismus im Primärtumor durchlaufen. Nur die Zellen, die diesen Selektionsmechanismus erfolgreich meistern, besitzen anschließend auch die Fähigkeit zur Metastasierung. Die Metastasierung erfolgt also erst in einem relativ späten Stadium der Karzinome bei einer Tumorgöße von mindestens  $1\text{cm}^3$  durch dem Primärtumor ähnelnde Tumorzellen. Die Metastasen selbst sind wiederum ebenfalls zur Metastasierung befähigt. Da die molekularen Charakteristiken des Primärtumors also denen der metastasierten Tumorzellen (sog. Disseminierte Tumorzellen, DTC) ähneln, kann der Ursprungstumor genutzt werden, um ein Therapieansprechen vorherzusagen [30].

**Das Modell der parallelen Progression:** Bei der parallelen Progression erfolgt die Streuung des Tumors schon in frühen Stadien. Die DTCs entwickeln sich dann zeitgleich mit dem Primärtumor an dem Ort der Metastasierung, durchlaufen jedoch andere Selektionsmechanismen und entwickeln infolgedessen andere genetische Veränderungen als der Primärtumor. Folglich ist es schwierig, anhand einer Analyse des Primärtumors das Ansprechen der DTCs auf die Therapie vorherzusagen [30].

### 1.2.2 Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

Bei zirkulierenden Tumorzellen (engl. Circulating tumour cells, CTCs) handelt es sich um Zellen mit Charakteristika des Primärtumors, die nach Ablösung aus dem Primärtumor Zugang zur Lymph- und Blutbahn haben und somit im peripheren Blut von Patienten detektierbar sind [31-32]. Erstmals wurden CTCs von Thomas Ashworth im Jahr 1869 im Blut eines Mannes mit metastasiertem Karzinom entdeckt. Er stellte hierbei die These auf, dass „cells identical with those of the cancer itself being seen in the blood may tend to throw some light upon the mode of origin of multiple tumours existing in the same person“ (Australian Medical Journal, Seiten 146-149) [33]. Mittlerweile hat sich gezeigt, dass CTCs tatsächlich durch ihre Zirkulation im Gefäßsystem die Grundlage für eine Metastasierung und anschließendes Wachstum in verschiedenen Geweben darstellen [28]. Die nach Infiltration anderer Organe einzeln oder als Cluster auftretenden Zellen, stellen die in Kapitel 1.2.1 beschriebenen DTCs dar. Eine der häufigsten Lokalisationen für das Auftreten von DTCs ist das Knochenmark [34].

CTCs sind folglich als Hauptmechanismus bei der Metastasierung und somit als Haupteinflussfaktor auf Prognose und Verlauf von Krebserkrankungen zu sehen. In zahlreichen Studien zeigte sich, dass sowohl das Auftreten von CTCs als auch von DTCs beim Mammakarzinom stark mit progressionsfreiem Überleben, Krankheitsrückfällen und Outcome assoziiert ist [35–40]. Der Nachweis von DTCs im

Knochenmark ging mit schlechterem fernmetastasenfreiem Überleben, schlechterem Gesamtüberleben und häufigeren Lokal-Rezidiven einher und stellt somit einen starken prognostischen Faktor für das Patientenüberleben dar [37-38; 41-42]. Beim Nachweis von CTCs im peripheren Blut zeigte sich abhängig von der Anzahl der detektierten Tumorzellen sowohl bei Patienten mit Mammakarzinomen in frühen Stadien als auch bei Patienten mit metastasierter Erkrankung ein verschlechtertes progressionsfreies und Gesamt-Überleben. Daher stellt auch die Messung von CTCs eine geeignete Möglichkeit zur Prognoseerstellung dar [35-36; 39-40].

DTCs und CTCs sind Äquivalente der Minimal Residual Disease (MRD, deutsch: Minimale Resterkrankung) [43]. Hierbei handelt es sich um nach oder während einer Behandlung im Körper verbliebene Zellen eines malignen Tumors, die durch konventionelle Bildgebung und Labortests nicht detektierbar sind [43-44], da die Patienten jedoch in diesem Stadium meist keine Symptomatik zeigen und sich in einem Milliliter Blut neben einige wenigen CTCs bis zu 10 Millionen Leukozyten und 5 Milliarden Erythrozyten befinden können [45]. Zur Detektion der CTCs und einer daraus folgenden Diagnostizierung einer MRD sind daher sehr sensitive Testmethoden notwendig.

Die CTC-Detektion erfolgt hierbei in zwei Schritten: Anreicherung und Identifizierung [46].

Die verwendeten Techniken zur Anreicherung basieren entweder auf physikalischen (z.B. Filtration nach Zelldichte oder -größe) oder immunologischen Eigenschaften (z.B. immunomagnetische Antikörper gegen Zelloberflächen-Antigene) der Tumorzellen [43].

Nach der Anreicherung erfolgt die Charakterisierung der CTCs entweder mittels direkter antikörperbasierter Methoden, beispielsweise Immunhistologie oder Immunzytologie, oder mittels indirekter Nachweismethoden auf Basis von Nukleinsäuren [43].

Bei der Immunhistologie werden spezifische Strukturen (Antigene) mit Hilfe von Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen oder radioaktiven Isotopen markiert sind, sichtbar gemacht. Die APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase) hat sich beispielsweise als Technik zum CTC-Nachweis etabliert [47]. Des Weiteren hat sich die Immunfluoreszenz in Studien als geeignete Technik herausgestellt [48].

Bei dem immunzytologischen Cell Search® System (Veridex, LLC®, Warren, USA), das als einziges System zum CTC-Monitoring bei Patienten mit metastasiertem Mamma-, Prostata- und kolorektalem Karzinom von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) freigegeben wurde, handelt es sich um ein automatisiertes System zur Anreicherung und Detektion der zirkulierenden Tumorzellen. Hierbei werden die Tumorzellen immunomagnetisch mit Hilfe eines Antikörpers gegen EpCAM aussortiert und anschließend mit Antikörpern gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 (pan-CK) und CD45 (ein Leukozyten-spezifischer Marker) sowie mit DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole-2) fluoreszenzmarkiert. CTCs stellen sich bei der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie als pan-CK und DAPI positiv und CD45 negativ dar [34].

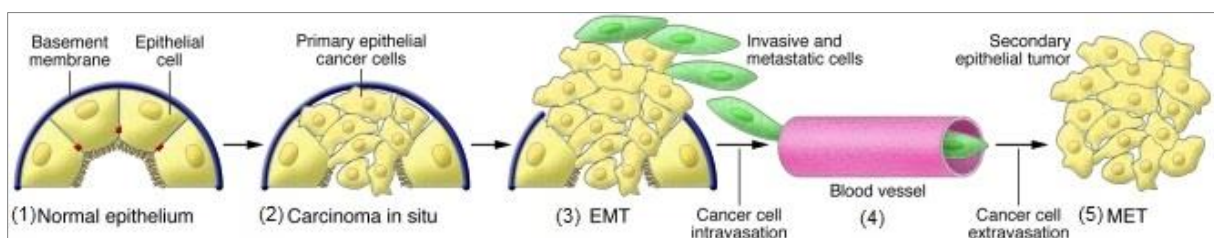
Die RT-PCR hat sich als geeignete Technik im Rahmen indirekter Nachweismethoden für zirkulierende Tumorzellen erwiesen. Beim AdnaTest® BreastCancerSelect (AdnaGen AG, Langenhagen, Germany) handelt es sich um ein RT-PCR-basiertes Testkit mit immunomagnetischer Anreicherung EpCAM- und MUC1-positiver Zellen. Im Anschluss an die Anreicherung erfolgt eine Multiplex-PCR für die Gene HER2, EpCAM und MUC1 [43].

Um die CTC-Diagnostik also erfolgreich zur Stadieneinteilung und Verbesserung der individualisierten Therapie nutzen zu können, dürfen nur die zirkulierenden Tumorzellen von einem Nachweisverfahren detektiert werden. Die Entwicklung einer solchen sensitiven und spezifischen Nachweismethode stellt eine große technische Herausforderung dar, da die Anzahl der Tumorzellen mit ca. einer CTC auf  $10^5$ - $10^7$  Blutzellen sehr gering ist [46]. Zudem hat sich gezeigt, dass CTCs zu einem großen Teil die epithelial-

mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen und folglich nicht ausschließlich über den Nachweis epithelialer Marker detektierbar sind, sondern einen spezifischeren Detektionsansatz benötigen [45; 49].

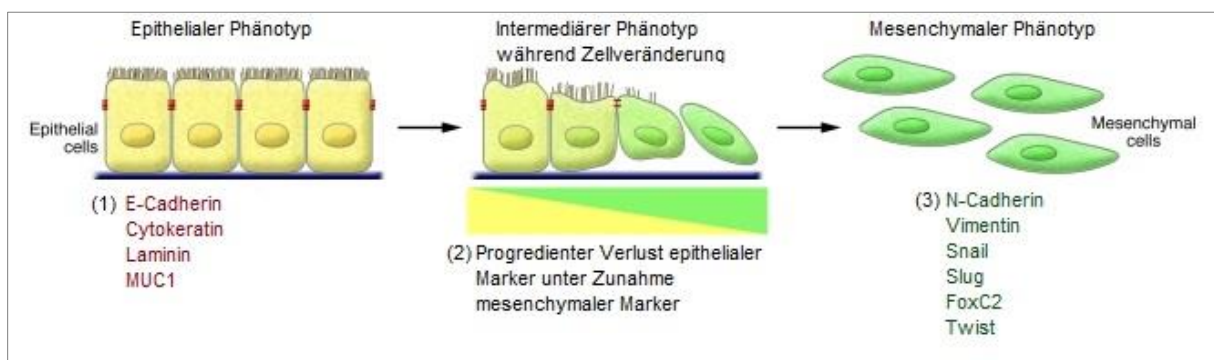
### 1.2.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der es epithelialen Zellen ermöglicht, mesenchymale Eigenschaften auszuprägen. Zu diesen Eigenschaften gehören gesteigerte Migrationsfähigkeit, Invasivität, Apoptoseresistenz und verstärkte Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix [50]. Die EMT ist somit einer der wichtigsten Schritte bei der Bildung von CTCs und im Rahmen des umgekehrten Prozesses, der Mesenchymal-epithelialen Transition (MET) nach Verlassen des Blutkreislaufes, auch grundlegend bei der Fernmetastasenbildung (siehe Abb. 1) [51].



**Abbildung 1: Beitrag der EMT zur Tumorentstehung (von links nach rechts):** (1) Darstellung eines normalen Epithels, (2) Ausbildung eines Carcinoma in Situ durch Primäre Tumorzellen, (3) und (4) Ausbildung invasiver Tumorzellen und Invasion in die Blutgefäße mittels EMT, (5) Ausbildung von Metastasen in entfernten Geweben mittels MET [50]

Die Umwandlung einer Zelle epithelialen in eine Zelle mesenchymalen Phänotypes erfolgt in einer Abfolge streng koordinierter Veränderungen (vgl. Abb. 2). Die EMT beginnt mit einem Verlust der apico-basalen Polarität und einer Lösung der Tight-Junctions. Zeitgleich lösen sich weitere Zell-Zell-Verbindungen, wie beispielsweise Adhärens- und Gap-Junctions, und die Basalmembran wird aufgelöst. Anschließend erfolgt der Ersatz epithelialer Zelloberflächenproteine wie E-Cadherin und Integrine durch solche mesenchymalen Phänotypes, wie N-Cadherin und Fibronectin. Zusätzlich wird das Zytoskelett durch Stress-Fibers und Vimentin verändert, sodass schlussendlich aus einer quaderförmigen Epithelialzelle eine spindelförmige Mesenchymalzelle entsteht [52].



**Abbildung 2: Ablauf der EMT:** Im Rahmen der EMT kommt zu einer Phänotypveränderung der Zellen vom (1) Epithelialen Phänotyp (mit z.B. E-Cadherin und Zytokeratinen als Markergenen) über (2) verschiedene Intermediäre Phänotypen zu (3) einem mesenchymalen Phänotyp (mit z.B. N-Cadherin und Vimentin als Markergenen) [50]

Die EMT ist in drei verschiedenen Situationen anzutreffen, weshalb es drei verschiedene Typen gibt. Typ 1 der EMT ist physiologischerweise während der Implantation, Embryogenese und Organentwicklung anzutreffen. Hierbei entstehen über komplexe Signalwege gesteuert

mesenchymale Zellen (Primäres Mesenchym), die später mit Hilfe der MET verschiedene Epithelien formen können. Dieser Typ bildet keine Fibrosen oder invasive Phänotypen.

Der zweite EMT-Typ ist sowohl mit den physiologischen Funktionen der Wundheilung und Geweberegeneration als auch mit der Pathologie der Organfibrose assoziiert [50]. Im Gegensatz zu Typ 1 wird Typ 2 der EMT durch Entzündung und Gewebeschädigung ausgelöst und normalerweise mit Ende der Entzündung gestoppt. Bei der Organfibrose scheint jedoch eine fortlaufende Entzündung weitere EMTs zu triggern [50].

Typ 3 der EMT ist mit Krebsprogression und Metastasierung assoziiert, da dieser Typ Zellen mit invasiven Fähigkeiten generiert. Diese EMTs treten vor allem in neoplastischen Zellen auf, die bereits verschiedene Veränderungen vor allem in Onkogenen und weiteren wachstumsfördernden Genen durchlaufen haben. Diese Veränderungen erhöhen die Wahrscheinlichkeit für ein Ansprechen auf EMT-fördernde Reize aus dem Tumorstroma. Diese Reize aus dem Tumorstroma, beispielsweise TGF- $\beta$  und PDGF (engl. Platelet derived growth factor), aktivieren wiederum EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, Twist oder FoxC2 in den Tumorzellen (vgl. Kapitel 1.4.), welche wiederum über verschiedene Wege den Ablauf der EMT steuern können [50].

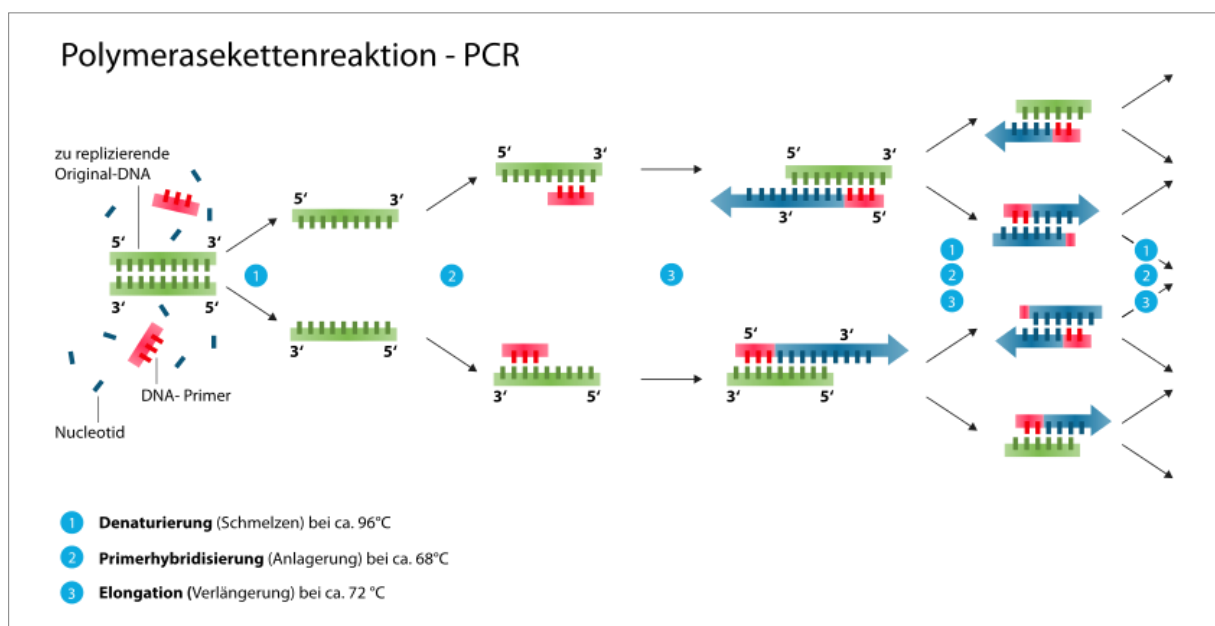
Nach Abschluss der EMT sind CTCs aufgrund des mesenchymalen Phänotyps zum Teil schwer detektierbar [53-54] und zeigen häufig auch nur noch geringe Ähnlichkeit mit ihrem Ursprungstumor [55]. Es ist also notwendig, ein sensitives und spezifisches Nachweisverfahren zu entwickeln, um auch zirkulierende Tumorzellen mesenchymalen Phänotyps im Blut von Krebspatienten nachweisen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die quantitative Echtzeit-PCR als Methode gewählt, um die zirkulierenden Tumorzellen anhand ihrer veränderten EMT-Gene von den mesenchymalen Blutzellen zu unterscheiden.

### 1.3 Quantitative Echtzeit-PCR als Arbeitsmethode

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction, PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur in-vitro Genamplifikation, die es ermöglicht, eine bestimmte DNA- oder RNA-Sequenz in großer Zahl zu vervielfältigen. Prinzipiell wird mit Hilfe der DNA-Polymerase die physiologische Replikation der DNA bei der Zellteilung simuliert.

Für die Durchführung einer PCR ist es notwendig, die DNA- bzw. RNA-Sequenz, also die Abfolge der Nukleotide, zumindest teilweise zu kennen und einen passenden Primer, Nukleosidtriphosphat-Moleküle und eine hitzestabile Polymerase zur Verfügung zu haben. Die Polymerase stammt von dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) und zeigt eine erhöhte Hitzestabilität, was eine erneute Enzymzugabe nach den Denaturierungsschritten unnötig macht [56].

Der Ablauf der PCR erfolgt in drei sich wiederholenden Schritten (vgl. Abb. 3), für deren wechselnde Temperaturstufen meist ein Thermocycler verwendet wird:



**Abbildung 3: Ablauf der PCR:** Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei ca. 96°C und führt zur Bildung zweier Einzelstrang-DNAs, hierauf folgt der Schritt der Primerhybridisierung in dem sich die Primer an die spezifischen DNA-Sequenzen anlagern und anschließend der Schritt der Elongation, bei dem die Polymerase einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Diese Schritte können so oft wiederholt werden, bis die Primer aufgebraucht sind [57]

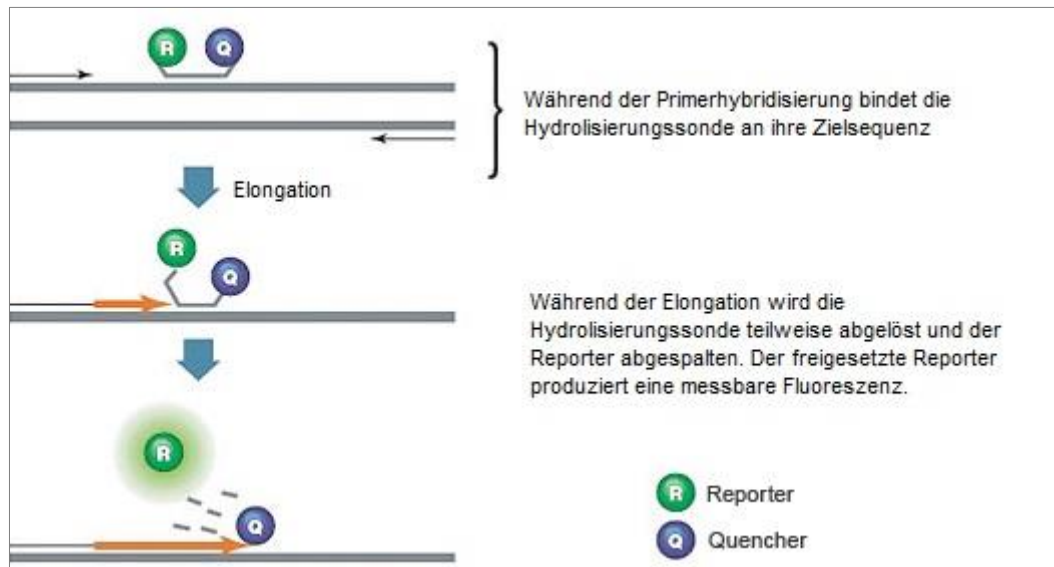
**Denaturierung (Melting):** Durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf ca. 96°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und eine Einzelstrang-DNA hergestellt. Ein schnelles Abkühlen auf 68°C verhindert die Rückbildung der Doppelhelix.

**Primerhybridisierung (Annealing):** Die Primer lagern sich spezifisch am 3'-Ende der zu replizierenden DNA an.

**Elongation (Amplifikation):** Nach leichtem Anheben der Temperatur auf die Optimaltemperatur der Polymerase (ca. 72°C), beginnt diese vom 3'-Ende des angelagerten Primers an den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren [56; 58].

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (engl. Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) handelt es sich um eine Polymerase-Kettenreaktion, bei der durch Hinzufügen von Fluoreszenzfarbstoffen zur PCR-Reaktion eine Messung von Fluoreszenzsignalen im PCR-Zyklus und anhand dieser Signale eine Quantifizierung der DNA möglich ist. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zu der Menge an PCR-Produkten zu und ermöglicht somit eine Messung [59].

Es gibt verschiedene mit Fluoreszenz markierte Sonden, um eine Detektion und Messung bei der qRT-PCR zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hydrolysierungssonde (TaqMan™, Applied Biosystems®) zur Messung verwendet. Bei der TaqMan™-Sonde handelt es sich um einen Primer, der am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter und am 3'-Ende mit einem Quencher versehen ist, der die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Durch die große Nähe des Reports zum Quencher ist nach Bindung des Primers keine Fluoreszenz messbar. Bei Freisetzung des Reporters durch Aktivität der Taq-Polymerase entfernt sich dieser von dem hemmenden Einfluss des Quenchers und ermöglicht somit die Messung der Emission des Reporterfarbstoffs (vgl. Abb. 4) [60]. Die Emission des Farbstoffs ist hierbei ein Maß für die Menge der erzeugten DNA [59].



**Abbildung 4: Mechanismus der Taq-Man-Sonde:** Im ersten Schritt bindet die Hydrolysierungssonde an ihrer Zielsequenz um dann im Laufe der Amplifikation aufgespalten zu werden. Der so vom hemmenden Einfluss des Quenchers befreite Reporter produziert eine messbare Fluoreszenz [60]

Eine weitere Möglichkeit zur Entwicklung der Fluoreszenz neben der Unterdrückung des hemmenden Quencher-Einflusses ist der sogenannte Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), bei dem Energie von einem Molekül auf ein anderes übertragen wird und somit Fluoreszenz auftritt. Ein Beispiel hierfür sind Hybridisierungssonden, die aus zwei Primern mit Farbstoffen bestehen. Diese lagern sich so an die DNA, dass bei der Amplifikation Donor- und Akzeptorfarbstoff nahe beieinander liegen und ein Energietransfer stattfinden kann [59; 61-62].

Zur Auswertung der qRT-PCR gibt es zwei häufig verwendete Methoden: die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung erfolgt ein Vergleich mit einer Standard-Kurve des zu untersuchenden Gens, um die Anzahl der Genkopien zu Beginn abzuschätzen. Diese Form der Quantifizierung ist nur für die Bestimmung der exakten Anzahl der Genkopien notwendig. Für die Aussage, in welchem Ausmaß sich die Expression eines Gens verändert hat – beispielsweise verdoppelt, halbiert etc. – ist eine relative Quantifizierung ausreichend. Hierbei erfolgt der Vergleich des PCR-Signals nicht mit einer Standardkurve sondern mit einer Referenzprobe, die beispielsweise eine unbehandelte Kontrollgruppe oder interne Kontrolle sein kann [59; 63]. Für diese Arbeit wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung verwendet, um die Genexpression zu ermitteln.

Als Referenzprobe werden sogenannte Haushaltsgene (engl. housekeeping genes) oder Kontrollgene verwendet. Diese sollten in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden und in ihrer Expression nur



gering variabel sein [64]. Im Idealfall wird die Expression der Kontrollgene zudem durch äußere Faktoren wie Stress, Krankheit, Zellzyklus oder Zelltyp so wenig wie möglich beeinflusst [59].

GAPDH und 18s rRNA sind als „housekeeping genes“ hervorragend geeignet, da diese in allen Zellen in großer Menge exprimiert werden und somit auch bei negativem Markergen eine gute Positivkontrolle darstellen [65]. Da es sich bei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) um ein Enzym der Glykolyse handelt, ist es in allen Zellen vorhanden und somit als Referenzgen hervorragend geeignet. Neben der Glykolyse ist GAPDH zudem an vielen weiteren zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur, Membran-Fusion, Transport und Zelltod beteiligt [66]. Als zweites Kontrollgen wurde die 18s rRNA gewählt. Hierbei handelt es sich um eine ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA), welche zusammen mit Proteinen Bestandteil der kleinen Untereinheiten der Ribosomen in eukaryontischen Zellen ist. 18s ist somit in allen Zellen enthalten [67]. Beide Gene sind bereits in zahlreichen Studien verwendet worden und haben sich als gebräuchliche Referenzgene etabliert [65; 68–70].

Die mit der relativen Quantifizierung bestimmten Daten können anschließend mittels der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet werden (vgl. Kapitel 2.1.3.3), um die relativen Veränderungen in der Genexpression wiederzugeben [63].

Um mit Hilfe der RT-PCR erfolgreich arbeiten zu können, müssen spezifische Markergene identifiziert werden, die eine Unterscheidung von Tumorzellen und hämatopoetischen Zellen ermöglichen [71]. Diese Markergene zum Nachweis von CTCs sollten in Tumorzellen, jedoch nicht in normalen Blutzellen exprimiert werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Markergene der epithelialen mesenchymalen Transition verwendet, die einen Nachweis der CTCs ermöglichen. Hierfür wurden die sieben Markergene CK19, Snail, Slug, FoxC2, Twist, Akt2 und ALDH1 ausgewählt, in den Spikingexperimenten auf ihre Tauglichkeit überprüft (vgl. Kapitel 2.4.1) und geeignete Marker anschließend auf die Patientenproben übertragen (vgl. Kapitel 2.4.2).

## 1.4 Markergene

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit ausgewählten Markergene, ihre physiologischen Funktionen und ihr Einfluss im Rahmen der Tumorentwicklung kurz dargestellt werden.

### 1.4.1 Zytokeratin 19 (CK19)

Zytokeratine sind Intermediärfilamente, die für die mechanische Stabilität und Integrität von Epithelzellen wichtig sind [72]. Die Genfamilie der menschlichen Zytokeratine besteht aus 20 verschiedenen Polypeptiden (CK1- CK20), die sich in eine saure (Typ I) und eine basische (Typ II) Subgruppe unterteilen lassen. CK9 bis einschließlich CK20 gehören zu den Typ I Zytokeratinen, wohingegen CK1 bis CK8 zu den Typ II Zytokeratinen gehören [73]. Ihre Expression ist dabei abhängig vom Zelltyp und Differenzierungsgrad des entsprechenden Gewebes und erlaubt somit nicht nur die Charakterisierung des epithelialen Ursprunges eines Gewebes, sondern auch die Unterscheidung verschiedener Entwicklungsstadien der zellulären Differenzierung. Epitheliale Tumore und Metastasen behalten meist das Keratinmuster ihres Ursprungsgewebes und erlauben so eine Tumortypisierung [72].

Zytokeratin 19 (CK19) ist das kleinste bekannte Keratin und gehört zu den sauren Zytokeratinen [74]. Es wird vor allem in einschichtigen Epithelien wie Brustdrüsengängen oder dem Pankreasgang exprimiert [72]. Eine Erhöhung des Serumspiegels von CK19 wurde bereits bei verschiedenen epithelialen Tumoren wie dem Zervix-, Lungen-, Leber-, kolorektalem und Schilddrüsen-Karzinom nachgewiesen [75–78]. Sein Nachweis bei Patienten mit Mammakarzinom geht mit einem verkürzten krankheitsfreien und Gesamtüberleben einher [79–81]. Da Zytokeratin 19 zwar in epithelialen Zellen, jedoch nicht in den mesenchymalen Zellen des Blutes exprimiert wird [82], wird es häufig im Rahmen einer APAAP-Färbung zur immunhistologischen Detektion von Krebszellen verwendet [83] und hat sich im Bereich der Mammakarzinomdiagnostik bereits als Marker zur CTC-Detektion in Knochenmark oder Blut etabliert [79; 82; 84–86]. Im Rahmen dieser Arbeit diente es ebenfalls als Marker zum CTC-Nachweis.

### 1.4.2 Snail (SNAI1)

Snail (SNAI1) gehört zusammen mit Slug (SNAI2) und Smuc (SNAI3) zur Snail-Familie der Zink-Finger Transkriptions-Faktoren [87]. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen eine DNA-bindende Domäne mit sogenannten Zink-Fingern zur Erkennung von Enhancer-Bereichen der DNA und werden daher Zink-Finger Transkriptions-Faktoren genannt. Auf zellulärer Ebene sind die Gene der Snail-Familie für die Regulation der Zell-Zell-Adhäsion zuständig. Über ihre Unterdrückung der E-Cadherin-Transkription, Förderung der Endozytose der Cadherine (die für die Zell-Zell-Verankerung zuständig sind) und Steigerung der Transkription mesenchymaler Gene, sind die SNAI-Gene einer der wichtigsten Trigger der EMT [88-89]. Aufgrund ihrer Regulationsfunktion bei der EMT sind die Gene der Snail-Familie unbedingt notwendig in der embryonalen Entwicklung, können jedoch bei abnormaler Aktivierung im Erwachsenenalter sowohl zu Tumor-Progression und -Wiederauftreten als auch zu Fibrosen führen [89].

Snail ist ein sehr instabiles Protein, das über verschiedenste Signalwege reguliert werden kann und erst im Zellkern seine Funktion entfaltet [87]. Bei der Tumor-Entwicklung bewirkt es nicht nur über seine Regulation der EMT sondern auch über seine Möglichkeiten zur Apoptose-Hemmung eine gesteigerte Malignität und Invasivität der Tumoren. Bei Patienten mit Magen- oder hepatozellulärem Karzinom war eine verstärkte Expression von Snail nachweisbar. Diese zeigte sich ebenfalls bei Patientinnen mit

Mammakarzinom [90]. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass diese gesteigerte Expression in starkem Ausmaß mit Metastasierung, Tumorrezidiven und einer schlechteren Überlebensprognose der Patientinnen einhergeht [91–93].

#### **1.4.3 Slug (*SNAI2*)**

Slug gehört ebenfalls zur Snail-Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren. Im Gegensatz zu Snail, welches vier Zinkfinger besitzt, sind bei Slug jedoch fünf Zinkfinger zur Interaktion mit der DNA vorhanden und ermöglichen eine andere Affinität und Interaktion mit der DNA. Wie auch Snail wirkt Slug über eine Repression von E-Cadherin und eine Aktivierung mesenchymaler Gene als Mediator der EMT [89]. Zudem besitzt es ähnlich *SNAI1* antiapoptotische Eigenschaften und kann somit das Tumor-Wachstum fördern [94-95]. In verschiedenen Studien konnte eine gesteigerte Expression von Slug bei Ösophagus-, Lungen-, Prostata- und Mammakarzinomen beobachtet werden. Diese korrelierte mit höheren Metastasierungsraten und schlechteren Prognosen der Patienten [96–99].

#### **1.4.4 *FOXC2***

Das Forkhead-Box-Protein C2 (*FOXC2*, auch *MFH1*) gehört zur Forkhead-Box (*FOX*) Familie der Transkriptionsfaktoren. Diese Familie wird durch eine ungefähr 100 Aminosäuren umfassende DNA-Bindedomäne (sog. Forkhead-Box) charakterisiert und reguliert Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Zelllebensdauer [100].

Das Gen *FOXC2* wirkt in der embryonalen Entwicklung bei der Zellproliferation und der Entwicklung von Niere, Ureter, Herz und Skelett mit [101]. Allerdings ist es auch mit Erkrankungen wie dem Lymphödem Distichiasis, welches in Folge der Mutation von *FOXC2* entsteht, und verschiedenen Krebsarten wie Gliomen, Zervix-, Ovarial-, Pankreas- und Mammakarzinomen assoziiert [101-105]. *FOXC2* ist über verschiedene Wirkmechanismen ein wichtiger Vermittler in der Karzinogenese. Zum einen steuert *FOXC2* die Angiogenese und somit die Blutversorgung des Tumors über die direkte Regulierung von für die Angiogenese wichtigen Genen und die Verbesserung der Epithelzellwanderung [106]. Zum anderen ist *FOXC2* ein wichtiger Regulator der EMT und kann auch von anderen Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug und Twist aktiviert werden. Im Gegensatz zu den übrigen EMT-steuernden Genen, erzeugt *FOXC2* jedoch keine verringerte Expression von E-Cadherin und scheint daher im Rahmen der EMT vor allem die Expression mesenchymaler Gene zu steuern [107]. Im Bereich der Mammakarzinome ist *FOXC2* insbesondere mit Triple negativen Karzinomen und weniger mit anderen Karzinomtypen assoziiert. Sein Auftreten korreliert mit höherer Invasivität, Metastasierungsrate, Tumorrezidiven und schlechteren Prognose [107–109].

#### **1.4.5 Twist**

Unter den EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren gehört Twist zur Familie der basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Beim Menschen gibt es mit Twist-1 und Twist-2 zwei Varianten, die für die embryonale Entwicklung wichtig sind [110], wobei in dieser Arbeit Twist-1 als Twist bezeichnet wird. Twist wird von Erwachsenen normalerweise nicht mehr exprimiert. Eine Expression geht daher stets mit pathologischen Prozessen einher [111]. Eine loss-of-function-Mutation kann zu einer seltenen kraniofazialen Fehlbildung, dem Saethre-Chotzen-Syndrom (SCS), führen [112]. Zudem besteht eine starke Assoziation mit verschiedenen Tumoren, wie Magen-, kolorektalen- und vor allem invasiv lobulären Mammakarzinomen sowie dem Sezary-Syndrom [113–117]. Hierbei geht die verstärkte Expression von Twist stets mit einer schlechteren Prognose und einem schlechteren Überleben einher [118].

Eine der wichtigsten Funktionen von Twist ist die Aktivierung der epithelial-mesenchymalen Transition. Diese wird von Twist nicht nur über die direkte und Snail-induzierte Inhibition der E-Cadherin-Transkription gesteuert, sondern auch über die Induktion mesenchymaler Marker, wie Fibronektin und N-Cadherin [113]. Desweiteren scheint Twist über die Generierung eines Phänotyps von Krebsstammzellen, Apoptose-Inhibition und eine Steigerung der Chemoresistenz zur Karzinomentstehung beizutragen [111].

#### **1.4.6 Akt2**

Das mutmaßliche Onkogen Akt2, auch als Proteinkinase B beta bezeichnet, codiert ein zur Akt-Familie der Serin/Threonin-Kinasen gehörendes Protein. Das codierte Protein ist eine generelle Proteinkinase, die verschiedenste Proteine phosphorylieren [119] und durch die Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) aktiviert werden kann. Akt2 ist somit Teil eines Signalweges, der sowohl in der gesunden Physiologie als auch in der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle spielt [120].

In der gesunden Physiologie spielt Akt2 eine wichtige Rolle im Bereich der Glukose-Homöostase und ist eng mit dem Auftreten von Typ-2-Diabetes verknüpft [121]. Im pathologischen Bereich besteht eine enge Assoziation zu verschiedenen Tumorformen wie dem Prostata-, Kolon-, Pankreas-, Ovarial- und Mammakarzinom [122–124].

Bei der Karzinogenese kann Akt2 sowohl als Aktivator als auch als Effektor von Twist wirken und somit über den Weg der EMT zur Zellmigration und Metastasierung beitragen [122]. Zudem scheint Akt2 über das Ausbilden von Kollagen-IV-bindenden Rezeptoren sowie die Regulation der Kollagensynthese und Aktivierung von Matrixmetalloproteasen die Zellmigration zu unterstützen [123]. Des Weiteren wirkt Akt2 förderlich auf das Zellüberleben. So verhindert Akt2 die Apoptose durch Inhibition der Caspase 9 und fördert den Zellzyklus indem es den Transport von Zellzyklus-Inhibitoren unterbindet [125].

Akt2 wurde schon in einigen Studien erfolgreich als EMT-Marker verwendet [126-127] und im Rahmen dieser Arbeit soll nun getestet werden, ob es als Marker zur CTC-Detektion ebenfalls geeignet ist.

#### **1.4.7 ALDH1**

ALDH1 gehört zur Familie der Aldehyddehydrogenasen. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die Aldehyde oxidieren und diese somit unschädlich machen. Diese Enzyme sind in nahezu allen menschlichen Geweben vorhanden, der Großteil ist jedoch in der Leber lokalisiert [128] und Teil des Alkoholstoffwechsels. Es gibt zwei verschiedene Isoformen: ALDH1 ist die zytosolische Form, wohingegen ALDH2 in den Mitochondrien lokalisiert ist [129].

Neben seiner physiologischen Funktion hat sich ALDH1 als geeigneter Marker zur Identifizierung von Tumorstammzellen bei verschiedenen Tumorformen, wie dem Prostata-, Magen-, Endometrium-, Lungen- und Mammakarzinom erwiesen [130–134]. Im Rahmen der Mammakarzinome war eine erhöhte Expression von ALDH1 mit schlechterer Prognose, schlechterem Überleben, aggressiveren Karzinom-Phänotypen und gesteigerter Invasivität assoziiert [134–137]. Des Weiteren zeigten verschiedene Studien, dass zirkulierende Tumorzellen sowohl EMT- als auch Tumorstammzellmarker aufweisen können [126-127; 138].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, geeignete Markergene der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) bei Brustkrebs mittels Real-Time-PCR zu identifizieren. Hierzu wurde ein zweistufiges Vorgehen gewählt:

- Zuerst wurde ein Modellsystem erstellt, in dem die Genexpression der Markergene CK19, Snail, Slug, FoxC2, Twist, Akt2 und ALDH1 an mit Tumorzellen versehen Blutproben gesunder Spender getestet wurde. Diese Vorstufe war vor Testung der Patientenproben notwendig, um die Technik und Marker zu überprüfen.
- Die Marker, die sich im Modellsystem als geeignet erwiesen hatten, wurden nun auf die Patientenproben übertragen und die Ergebnisse ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen das Auffinden von CTCs im Blut von Brustkrebspatientinnen erleichtern. Die genauere Identifizierung und Charakterisierung von CTCs und der Nachweis einer bereits durchlaufenen EMT könnte eine eindeutigere Stadieneinteilung und infolgedessen eine individualisiertere Therapie und verbesserte Nachsorge bei Mammakarzinompatientinnen ermöglichen. Zudem könnten Risikopatientinnen für Metastasierung im Sinne einer parallelen oder linearen Progression identifiziert und frühzeitig auf Metastasen kontrolliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verfahren

Im Folgenden werden die Verfahrensschritte zur Zellisolierung, Isolierung der RNA aus dem Zellpellet, sowie Gewinnung der cDNA aus dem Spenderblut bzw. den Patientenproben erläutert. Zudem werden alle verwendeten Materialien aufgelistet.

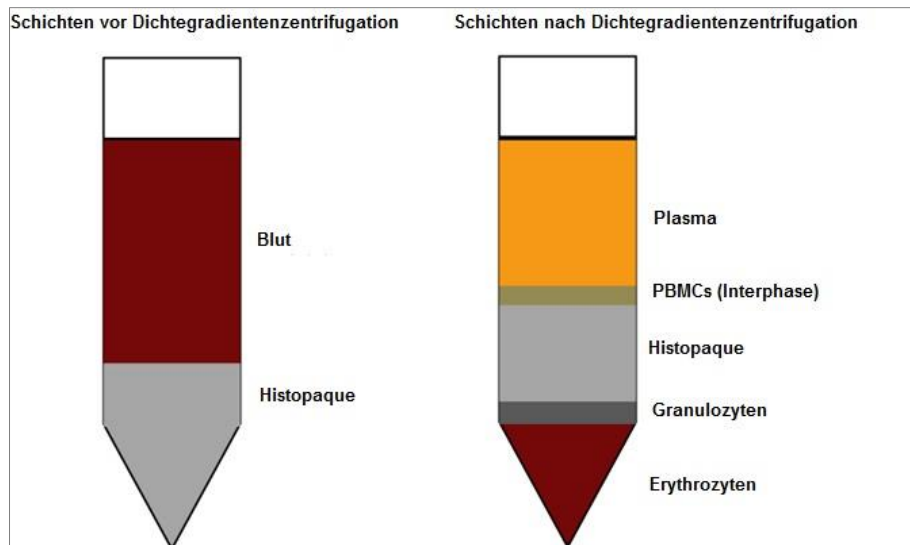
#### 2.1.1 Zellisolierung aus EDTA-Vollblut

Die Isolierung der Leukozyten und CTCs aus dem EDTA-Vollblut von Probandinnen und Patientinnen erfolgte über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Histopaque 1077.

##### Material

- Material zur Blutentnahme:
  - EDTA-Röhrchen
  - Butterfly-Kanüle
  - Desinfektionsmittel
  - Tupfer
  - Stauschlauch
- PBS Dulbecco
- Histopaque 1077
- 50 ml FALCON-Röhrchen
- Zentrifuge
- Elektrische Pipettierhilfe und Pipettenspitzen
- -80°C Gefrierschrank

Zu Beginn wurden den gesunden Probandinnen im Alter von 18-50 Jahren je 20 ml Blut mit Hilfe von Butterfly-Kanülen abgenommen. Das Blut wurde in ein 50 ml FALCON-Röhrchen überführt und mit PBS auf 30 ml aufgefüllt. Auf die antemperierte 20 ml Histopaque wurde vorsichtig, möglichst ohne die Phasen zu vermischen, das Blut/PBS-Gemisch geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation zur Auftrennung der Blutbestandteile (bei einem Gradient von 400xg für 25 Minuten bei Raumtemperatur, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation waren verschiedene Phasen sichtbar (vgl. Abb. 5): Die oberste Schicht war das Serum, auf das die Interphase (auch „Buffy Coat“ genannt) folgte. Diese bestand aus den „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMCs), also Leukozyten und CTCs. Darunter befanden sich Histopaque und Erythrozyten. Die Interphase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein anderes FALCON-Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Hierauf erfolgte eine erneute Zentrifugation zur Waschung (bei einem Gradient von 250xg für 10 Minuten bei 4°C, ohne Bremse). Der hierbei entstandene Überstand wurde verworfen und das am Boden befindliche Pellet bei auf dem Kopf stehendem FALCON-Röhrchen für einige Minuten getrocknet. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.



**Abbildung 5: Auftrennung der Blutbestandteile mit Hilfe von Histopaque:** Vor Dichtegradientenzentrifugation zeigt sich eine Schichtung in Blut und Histopaque, wohingegen nach der Dichtegradientenzentrifugation eine Auftrennung des Bluts in Plasma, „peripheral blood mononuclear cells“, Histopaque, Granulozyten und Erythrozyten stattgefunden hat [139]

## 2.1.2 Gewinnung von RNA und cDNA

### 2.1.2.1 Extraktion der RNA

Die Extraktion der RNA erfolgte nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Extraktion mit Hilfe von Trizol innerhalb von zwei Tagen

#### Tag 1

##### Material

- Zellpellet in 50 ml FALCON-Röhrchen
- RNase-freie Eppendorf-Tubes
- Trizol
- Chloroform
- Isopropanol
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Zentrifuge
- -20°C Gefrierschrank

Das Zellpellet wurde aufgetaut und vorsichtig durch Auf- und Abziehen in der Pipettenspitze in 1 ml Trizol gelöst. Anschließend wurde es in ein Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Eppendorf-Tube gut verschlossen und mit Hilfe des Vortexmischers für einige Minuten gemischt, bis die Flüssigkeit ein milchiges Aussehen bekam. Nach der hierauf folgenden Zentrifugation (bei einem Gradienten von 12000xg für 12 Minuten bei 4°C, mit Bremse) zeigten sich drei Phasen. Die obere, klare Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig in ein anderes Eppendorf-Tube überführt, der Rest wurde verworfen. Nach der Zugabe von 500µl Isopropanol und einer erneuten Mischung mit dem Vortexmischer wurde das Tube zum Ausfällen der RNA für mindestens 1 Stunde bei -20°C tiefgefroren.

## **Tag 2**

### **Material**

- RNase-freies Eppendorf-Tube mit RNA des Vortages
- Ethanol 75%
- RNase-freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Zentrifuge
- Kleine Tischzentrifuge
- -20°C Gefrierschrank

Die RNA-Lösung des Vortages wurde aus dem Gefrierschrank genommen und zentrifugiert (bei einem Gradienten von 12000xg für 12 Minuten bei 4°C, mit Bremse). Hierbei bildete sich am Boden des Eppendorf-Tubes ein RNA-Pellet. Der klare Überstand wurde vorsichtig am vorderen Rand abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde 1 ml 75%iges Ethanol auf das Pellet gegeben und das Eppendorf-Tube erneut zentrifugiert (bei einem Gradienten von 12000xg für 8 Minuten bei 4°C, mit Bremse). Der Alkoholüberstand wurde vorsichtig, ohne das Pellet zu beschädigen abgenommen und das Tube dann ungefähr eine Minute bei 14000xrpm zentrifugiert, um den restlichen Alkohol abzutrennen. Nach Entfernung des Alkoholüberstandes wurde das Pellet für ungefähr fünfzehn Minuten zum Trocknen offen unter dem Abzug stengelassen. Nach Antrocknen des Pellets wurde die RNA in 20 µl Aqua ad iniectabilia gelöst und bis zur Konzentrationsbestimmung erneut bei -21°C eingefroren.

### **2.1.2.2 Messung der Konzentration und Reinheit der RNA**

#### **Material**

- RNase-freie Eppendorf-Tubes mit RNA-Proben
- RNase-freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- Ethanol 75%
- Pipette mit Pipettenspitzen
- Photometer mit Mess-Küvette
- Vortexmischer
- -20°C Gefrierschrank

Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Photometers bestimmt. Hierbei wurde die Reinheit durch die Ratio angegeben, welche sich als die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (entspricht der Absorption von RNA) geteilt durch die Absorption bei 280 nm (entspricht der Absorption von Protein) errechnet. Für die weitere Verarbeitung wurde nur möglichst hochqualitative RNA mit einer Ratio zwischen 1,7 und 2,0 verwendet, um eine hohe Reinheit der RNA zu gewährleisten.

Die RNA-Proben wurden aufgetaut und derweil das Photometer vorbereitet. Als Nullprobe wurden 4 µl RNase-freies Wasser in die Messzelle gegeben und gemessen. Anschließend wurde die Messzelle ordnungsgemäß mit 75% Ethanol, Aqua ad iniectabilia und einem trockenen Tuch gereinigt. Nach dem Vortexen wurden 4 µl der RNA-Probe in die Messzelle pipettiert und gemessen. Die Konzentration in µg/µl und die Ratio (A260/A280) wurden hierbei für jede Probe dokumentiert. Die RNA-Probe wurde anschließend zurück in das Eppendorf-Gefäß pipettiert und die Messzelle wie oben angegeben gereinigt. Anschließend wurde die RNA-Probe erneut bei -20°C eingefroren.



### **2.1.2.3 Berechnung der RNA-Menge und Umschreibung in cDNA**

#### **Berechnung**

##### **Material**

- RNase-freie Eppendorf-Tubes mit RNA-Proben
- RNase-freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- Vakuumzentrifuge

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden 4 µg RNA benötigt, für die jedoch ein Gesamtvolumen von maximal 6 µl vorgegeben war. Aufgrund der mit dem Photometer bestimmten Konzentration von µg RNA pro µl RNase-freiem Wasser, war die Berechnung des benötigten Volumens möglich. Bei RNA-Proben, die aufgrund ihrer Konzentration 4 µg RNA in weniger als 6 µl erreichten, wurde das Volumen bei Bedarf mit Aqua ad iniectabilia auf 6 µl ergänzt. Bei Proben, deren errechnetes Volumen größer als 6 µl war, um die benötigte RNA-Menge zu erreichen, bestand die Möglichkeit durch eine Vakuumzentrifugation die Konzentration zu erhöhen und somit das Maximalvolumen einzuhalten.

#### **Umschreibung der RNA in cDNA**

Um die gewünschte PCR durchführen zu können, erfolgte mittels reverser Transkription die Umschreibung der extrahierten RNA in eine cDNA.

##### **Material**

- RNase-freie Eppendorf-Tubes mit RNA-Proben
- Primer zur Umschreibung (Oligo-dTs)
- Puffer zur Umschreibung (Annealing Buffer)
- Reaction Mix
- Enzyme Mix
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Vortexmischer
- Hotblock
- -20°C Gefrierschrank

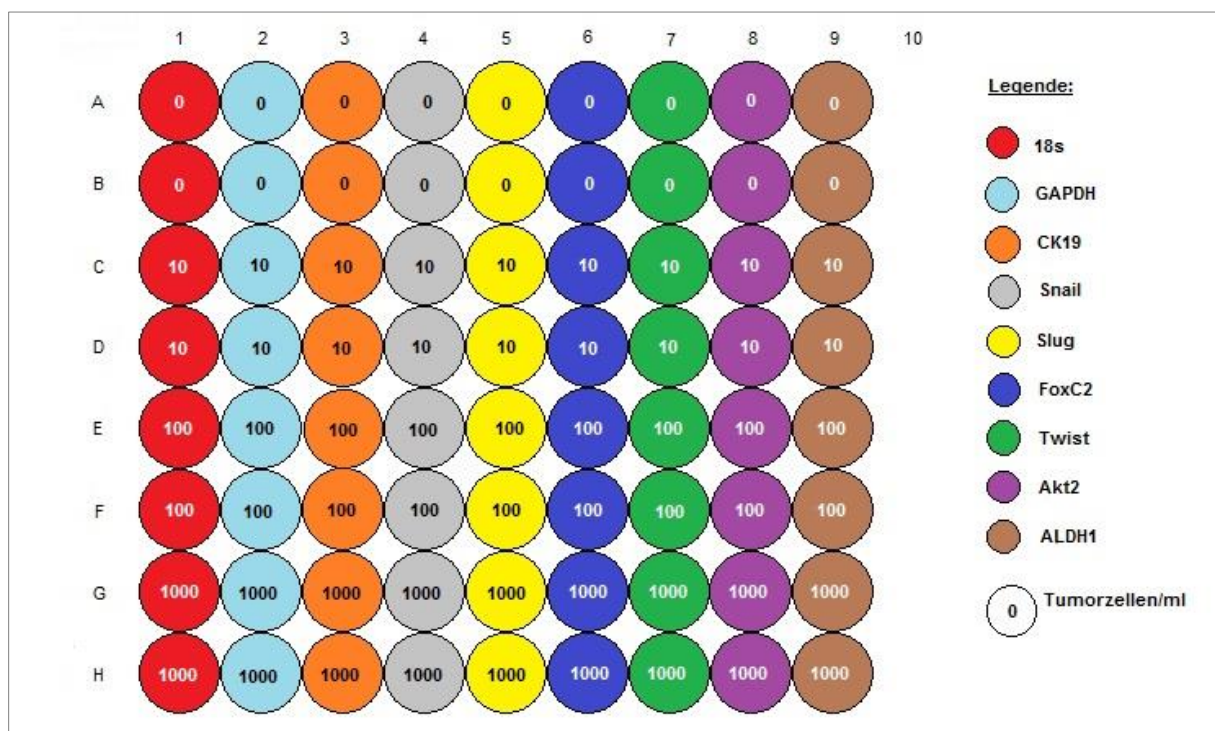
Die Umschreibung der RNA in die cDNA wurde mit Hilfe des invitrogen SuperScript III First-Strand Synthesis Super-Mix (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die RNA-Proben aufgetaut, anzentrifugiert und das errechnete Volumen für 4 µg RNA in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Auch der aufgetaute Annealing Buffer und die Oligo-dTs wurden für ungefähr eine halbe Minute auf den Vortexmischer gehalten und anzentrifugiert. Unter Lagerung auf Eis wurden je 1 µl Annealing Buffer und 1 µl der Oligo-dTs zu den RNA-Proben hinzugefügt, so dass die Gesamtmischung ein Volumen von 8 µl besaß. Nach dem Vortexen wurde das RNA/Primer/Puffer-Gemisch für 5 Minuten bei 65°C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden die RNA-Proben erneut auf Eis gestellt und jeweils 10 µl vorgefertigten Reaction Mix hinzugefügt. Der Enzym-Mix wurde aus dem Gefrierschrank genommen, für circa eine halbe Minute gevortext und anzentrifugiert. Nachdem 2 µl Enzym-Mix zu den RNA-Proben hinzugefügt und vermischt wurden, erfolgte eine Inkubation der Proben für 50 Minuten bei 50°C. Um die Reaktion zu stoppen, wurden anschließend die Enzyme durch eine Inkubation für 5 Minuten bei 85°C im Thermoblock denaturiert. Anschließend wurde die cDNA im -20°C Gefrierschrank eingefroren.

### 2.1.3 Quantitative Real-Time PCR

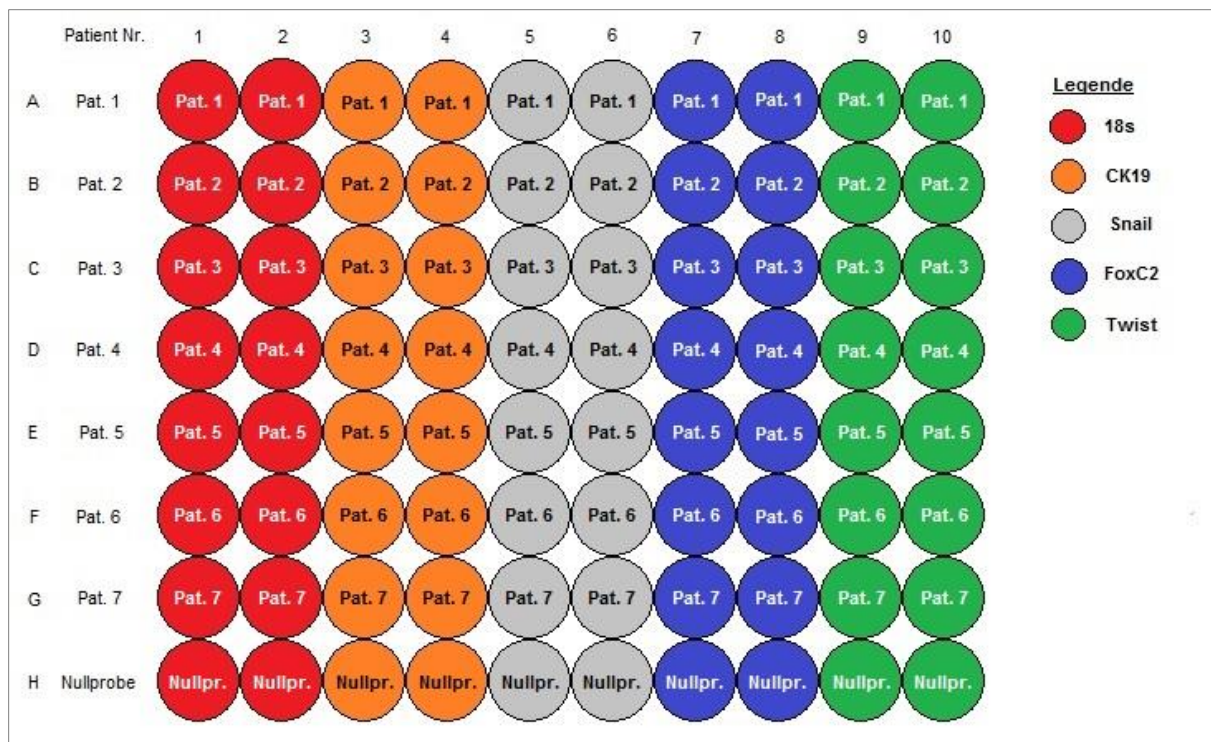
Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. PCR) ermöglicht es eine bestimmte DNA- oder RNA-Sequenz in vitro zu vervielfältigen. Bei der quantitativen Real-Time PCR wird zudem durch die Messung eines Fluoreszenzsignals im PCR-Zyklus die Quantifizierung der DNA ermöglicht. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde die Veränderung der Genexpression im Sinne einer relativen Quantifizierung – beispielsweise Verdopplung der Genexpression – ermittelt.

#### 2.1.3.1 Plattenbelegung

Mit Hilfe der RT-PCR wurden die verarbeiteten Blutproben auf Expression unterschiedlicher Gene untersucht. Hierbei wurde stets auf eine optimale Plattenbelegung geachtet. Die folgende Abbildung 6 stellt die Plattenbelegung in den Spikingversuchen dar. Hierbei wurden für jedes zu testende Gen je zwei Wells mit einer Tumorzellzahl von 0 Tumorzellen pro Milliliter, 10 Tumorzellen pro Milliliter, 100 Tumorzellen pro Milliliter und 1000 Tumorzellen pro Milliliter belegt. Bei den Patientenversuchen war die Belegung von insgesamt 16 PCR-Platten möglich, die alle wie in Abbildung 7 gezeigt mit jeweils 7 Patientenproben und einer Nullprobe belegt wurden. Hierbei wurden jeweils zwei Wells pro Markergen beziehungsweise Houskeeping-Gen pro Patient nebeneinander belegt.



**Abbildung 6: Plattenbelegung in den Spikingversuchen für die RT-PCR** wobei die Farben jeweils das Markergen (vgl. Legende) und die Zahlen in den Kreisen die Anzahl der Tumorzellen/ml repräsentieren



**Abbildung 7: Plattenbelegung in den Patientenversuchen für die RT-PCR**, wobei auch hier die Farben jeweils die Markergene und die Beschriftung in den Kreisen jeweils die Patienten-Nummer repräsentieren.

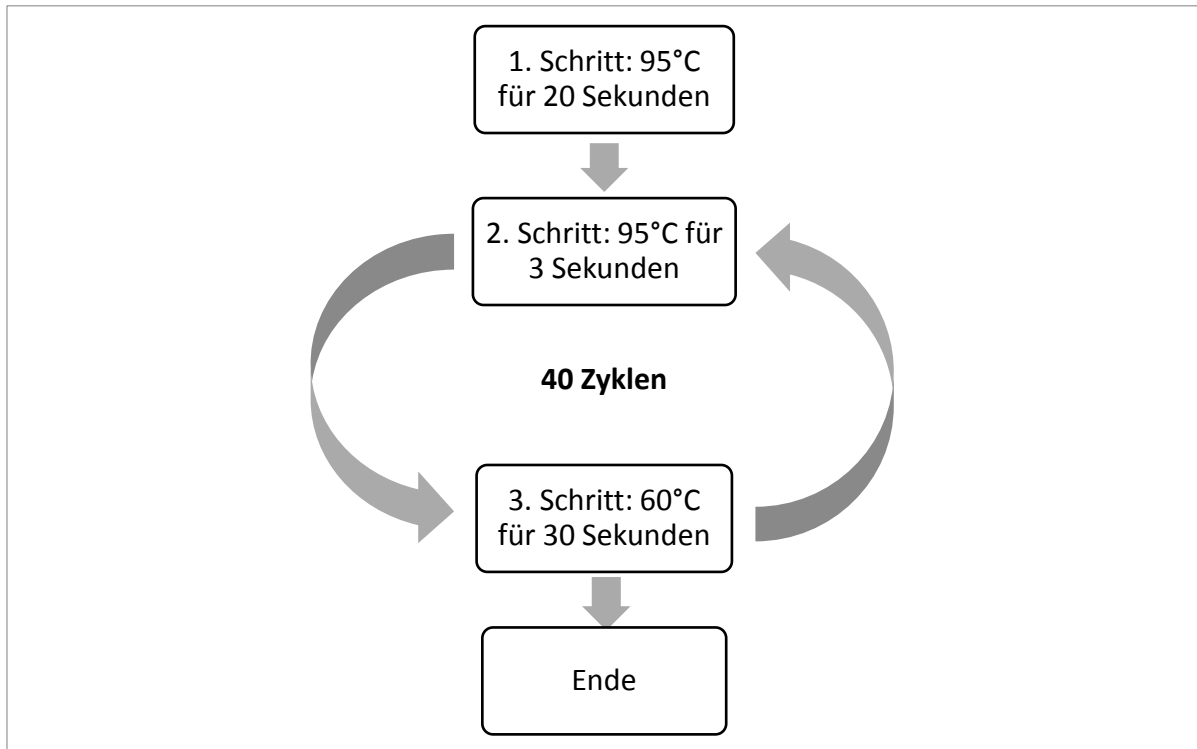
### 2.1.3.2 Probenvorbereitung und Pipettieren

#### Material

- cDNA aus der Umschreibung
- RNase-freies Wasser (Aqua ad iniectabilia)
- Mastermix (TaqMan® Fast Universal PCR MasterMIX (2x))
- Primer für 18s, GAPDH, CK19, Snail, Slug, FoxC2, Twist, Akt2, ALDH1
- RNase-freie Eppendorf-Tubes
- 96 Well RT-PCR-Platte
- PCR-Platten-Abdeckfolie
- Pipette und Pipettenspitzen
- Vortexmischer
- Zentrifuge
- TaqMan PCR-Gerät

Die Auswertung der PCR-Probe durch das PCR-Gerät wurde vorbereitet, indem die Plattenbelegung einschließlich verwendeter Genmarker mit 18s als endogener Kontrolle und Spiking- bzw. Patientenprobenmengen in das PCR-Notebook eingegeben und abgespeichert wurden. Anschließend wurde der PCR-Mix für jedes Gen vorbereitet. Hierfür wurden für jede cDNA-Probe 10 µl TaqMan® Fast Universal PCR MasterMIX (2x), 1 µl Primer und 7 µl RNase-freies Wasser in einem Eppendorf-Tube zusammengeführt und während des Pipettierens der cDNA im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde die cDNA aufgetaut, mit dem Vortexmischer gemischt und dann zügig mit jeweils 2 µl in die entsprechenden Wells der PCR-Platte pipettiert. Danach wurden je 18 µl des vorbereiteten PCR-Mix in jedes cDNA-beihaltende Well pipettiert, woraus sich eine Gesamtmenge von 20 µl pro Well ergab (bestehend aus 2 µl cDNA und 18 µl PCR-Mix für das jeweilige Gen). Luftblasen wurden bei den

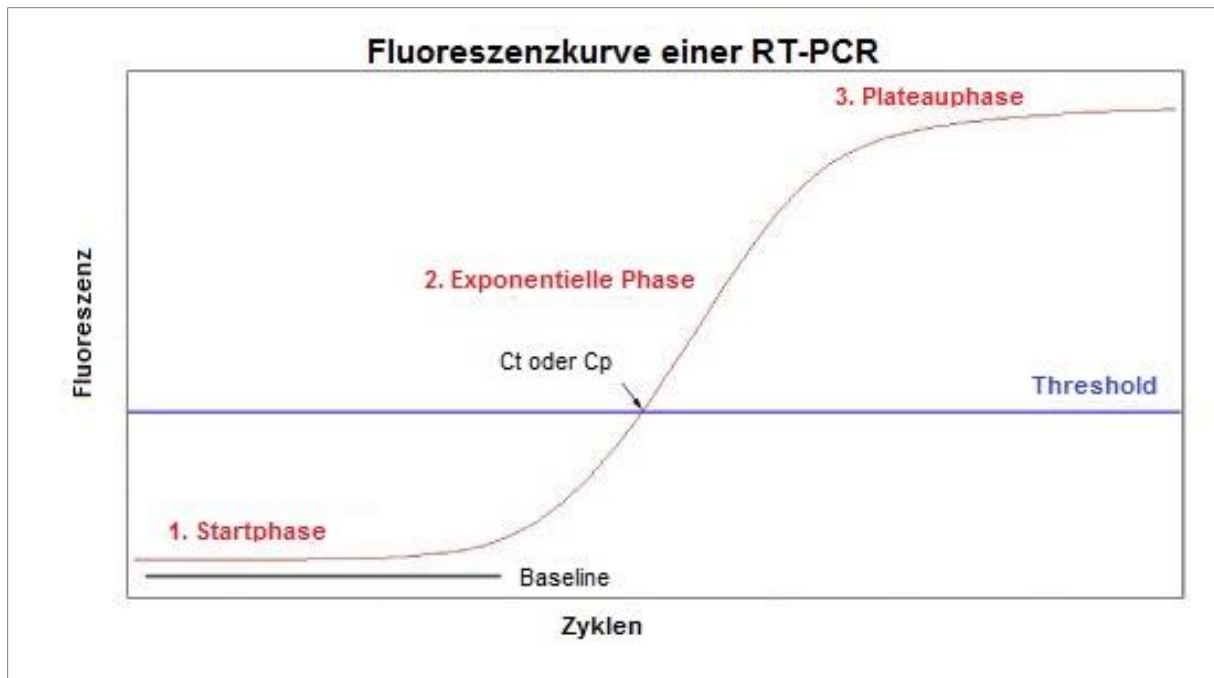
Pipettievorgängen so gut wie möglich vermieden und falls dennoch vorhanden vorsichtig aus dem Well entfernt. Im Anschluss wurde die Platte mit der Abdeckfolie bedeckt und die Folie vorsichtig festgestrichen. Um die gesamte Menge an cDNA und PCR-Mix am Boden des Wells zu haben, wurde die fertige Platte zentrifugiert (bei einem Gradienten von 2000rpm für 1 Minute bei 18°C, mit Bremse). Die PCR-Platte konnte dann in das PCR-Gerät eingesetzt werden und die PCR gestartet werden. Hierbei lief das in Abbildung 8 dargestellte Temperaturprotokoll ab.



**Abbildung 8: Temperaturprotokoll der RT-PCR** mit dem typischen Ablauf in den 3 Schritten, sowie 40-maliger Wiederholung des 2. und 3. Schrittes

### **2.1.3.3 Auswertung der RT-PCR**

Die RT-PCR wurde mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Im Rahmen der relativen Quantifizierung (vgl. 1.3) wurde die Expression des Markergens mit der des Housekeeping-Gens (18s) verglichen. Dieser Vorgang nennt sich Normalisierung [140]. Die PCR ermöglicht durch wiederholte Replikation eine Zunahme der DNA und damit verbunden eine proportionale Steigerung der Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz wird während des PCR-Zyklus gemessen und ermöglicht eine Quantifizierung der Genexpression. Des Weiteren lassen sich Fluoreszenzkurven erstellen, die den Verlauf der DNA-Replikation zeigen. Diese Kurven bestehen aus drei Phasen (vgl. Abb. 9): In der Startphase ist die DNA-Menge gering, verdoppelt sich dann unter Optimalbedingungen in der folgenden exponentiellen Phase und stagniert schließlich in der Plateauphase.



**Abbildung 9: Typischer Fluoreszenzkurvenverlauf einer RT-PCR** mit der Startphase, der exponentiellen Phase und der Plateauphase, sowie dem eingezeichneten Ct-Wert [141]

Die Plateauphase resultiert aus einer Hybridisierung der entstandenen Fragmente der Zielsequenz, wodurch die weitere Replikation gehemmt wird. Die Quantifizierung wird zu Beginn der exponentiellen Phase durchgeführt. Der hierbei bestimmte Ct-Wert (engl. Threshold Cycle, „Schwellenwert-Zyklus“) gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz des zu messenden Gens erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Ermittlung dieses Wertes wurde sowohl für das Kontrollgen als auch das Zielgen durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Normalisierung, um Variationen der eingesetzten DNA-Menge auszugleichen [59; 140]. Ziel der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ist die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio). Hierfür wird im ersten Schritt zur Berechnung des  $\Delta Ct$  und zur Normierung für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des Markergens subtrahiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Berechnung des  $\Delta\Delta Ct$  durch Subtraktion des  $\Delta Ct$  der Kontrolle (in dieser Arbeit bestehend aus gesunden Spenderinnen ohne Tumorzellen) vom  $\Delta Ct$  der behandelten Proben (hier: Brustkrebspatientinnen). Die Relative Quantifizierung (RQ), also die Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen behandelter Probe und Kontrolle normalisiert auf ein Referenzgen, erfolgt durch Einsetzen des  $\Delta\Delta Ct$ -Wertes in die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [140; 63]. Die notwendigen Berechnungen lauten wie folgt:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct_{\text{Markergen}} - Ct_{\text{Kontrollgen}} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}} \\ RQ &= 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad [140]\end{aligned}$$

Ein RQ-Wert  $> 1$  zeigt eine Steigerung der Genexpression des Zielgens gegenüber dem Kontrollgen an, wohingegen  $RQ < 1$  für eine verminderte Genexpression im Vergleich zur Negativprobe spricht [63; 140; 142]. In dieser Arbeit erfolgte die Berechnung der Ct-,  $\Delta Ct$ -,  $\Delta\Delta Ct$ - und RQ-Werte aus der Fluoreszenzintensität mit Hilfe der SDS-Software. Anschließend konnten die Werte in Microsoft® Excel™ übertragen und entsprechende Graphen erstellt werden.

## **2.2 Zellkulturen**

Zur Testung der oben erläuterten Verfahren wurden Vorversuche durchgeführt. Hierfür wurde im Rahmen des sogenannten Spikings Blut von gesunden Probandinnen mit Brustkrebszellen aus verschiedenen Zelllinien versetzt. Im Folgenden soll die Kultivierung sowie die Berechnung der Anzahl der hinzuzufügenden Zellen erläutert werden.

### **2.2.1 Zelllinien**

Für die Spikingversuche wurde mit einer Mischung zweier verschiedener Brustkrebszelllinien gearbeitet. Zum einen wurde die Zelllinie MCF-7 verwendet, die 1970 von Herbert D. Soule aus dem Pleuraerguss einer mastektomierten Patientin mit Pleurametastasen isoliert wurden [143]. Die Zellen sind epithelialen Ursprungs und stammen von einer 69 Jahre alten, kaukasischen Frau [144]. Die Besonderheit dieser Brustkrebszelllinie liegt darin, dass ihr Östrogen-Rezeptor (ER) positiv ist [143]. Die zweite genutzte Zelllinie besteht aus MDA-MB-231-Zellen, die ebenfalls aus einem metastatischen Pleuraerguss eines Adenokarzinoms stammen. Die Patientin war eine 51 Jahre alte, kaukasische Frau. Die Zellen sind epithelialen Ursprungs [145].

### **2.2.2 Kultivierung der Zelllinien und Abnahme**

Material

- Zellkulturflaschen 75cm<sup>2</sup>
- Sterilbank
- CO<sub>2</sub>-Inkubator
- Zelllinie MCF-7 bzw. MDA-MB-231
- PBS Dulbecco
- Dulbeccos MEM (DMEM) with stable glutamine
- Fetales Kälberserum (FCS)
- Antibiotikallösung (Penicillin/Streptomycin)
- Trypsin-EDTA-Lösung
- 50 ml FALCON-Röhrchen
- Elektrische Pipettierhilfe und sterile Pipetten (5 und 10 ml)
- Abfallbehälter

Die Kultivierung wurde gemäß den Empfehlungen des Lieferanten (American Type Culture Collection (ATCC), Wesel, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden mit ihrem Zellkulturmedium in entsprechenden Zellkulturflaschen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) aufbewahrt. Das Zellkulturmedium bestand aus Dulbeccos MEM (Modified Eagle Medium), das mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS) und 1% einer Antibiotikallösung aus Penicillin und Streptomycin versehen wurde. Der Austausch des Mediums sowie die Abnahme der Zellen für die Spiking-Experimente wurden zur Vermeidung einer Kontamination stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden nur die notwendigen Materialien auf die Sterilbank gestellt, nachdem diese zuvor mit einem Flächendesinfektionsmittel gereinigt wurde. Die nötigen Materialien waren:

- Ein mit Parafilm verschlossenes Kulturmedium
- Ein steriles PBS
- Das FALCON-Röhrchen mit Trypsin/EDTA
- Die Pipettierhilfe mit zugehörigen sterilen 5 ml bzw. 10 ml Pipettenspitzen

- Das Abfallbehältnis für das verbrauchte Medium
- Beschriftete 50 ml FALCON-Röhrchen für die abgenommenen Zellkulturen und die Zellkulturen.

Zuerst wurde das verbrauchte Kulturmedium in den bereit stehenden Abfall abgegossen. Danach wurde die Flasche vorsichtig mit PBS gespült, um auch die letzten Reste des Mediums zu lösen. Danach wurde das PBS abpipettiert und in den Abfall gegeben. Anschließend wurden 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellkultur gegeben, die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt und für ca. 10 Minuten in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt um die Zellen von der Bodenplatte der Zellkulturflasche zu lösen. Die Zellen wurden durch sanftes Klopfen gegen die Hand von der Platte gelöst und dann mit 7 ml Kulturmedium auf 10 ml ergänzt. Hiervon wurden 9 ml Medium/Zellen-Gemisch entnommen und in ein vorbereitetes FALCON-Röhrchen überführt. Das in der Zellkulturflasche verbleibende Gemisch wurde durch 9 ml Medium ergänzt, die Flasche verschlossen und zurück in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt.

### **2.2.3 Einfrieren von Zellen**

#### **Material**

- FALCON-Röhrchen mit abgenommenen Zelllinien
- 1,5 ml Cryoröhrchen
- Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)
- Eis aus dem Eiscrusher
- Sterilbank
- Pipetten und Pipettenspitzen
- -20°C Gefrierschrank
- -80°C Gefrierschrank
- Flüssiger Stickstoff

Die Zellkulturen wurden wie oben beschrieben abgenommen und in beschriftete FALCON-Röhrchen überführt. Es wurden 900µl DMSO hinzugefügt, um die Zellen beim Einfrieren zu schützen, und gut mit der Zellkultur vermischt. Anschließend wurde das Zellkultur/DMSO-Gemisch auf passend beschriftete Cryoröhrchen verteilt und auf Eis gestellt. Nach dem Befüllen aller Cryoröhrchen wurden diese für 2 Tage im -20°C Gefrierschrank gelagert, dann in den -80°C Gefrierschrank überführt und nach einigen Tagen zur dauerhaften Lagerung in einem Tank mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **2.2.4 Auftauen eingefrorener Zellen**

#### **Material**

- 15ml FALCON-Röhrchen
- 1,5 ml Cryoröhrchen mit eingefrorener Zellkultur
- Zellkulturmedium (DMEM + 10% FCS + 1% P/S)
- Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>
- Sterilbank
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Abfallbehältnis

Die gefrorenen Zellkulturen wurden aus dem Tank mit flüssigem Stickstoff entnommen und aufgetaut. Derweil wurden die Zellkulturflaschen und FALCON-Röhrchen mit dem Name der Zellkultur und dem

Datum beschriftet. Anschließend wurden je 10 ml Zellkulturmedium in die beschrifteten Gefäße pipettiert. Die aufgetauten Zellkulturen wurden in das zugehörige Falcon geschüttet und anschließend zentrifugiert (bei einem Gradienten von 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur, mit Bremse). Hierbei bildete sich ein Zellpellet, dessen Überstand bis auf einen 1 ml abpipettiert und verworfen wurde. Anschließend wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette das Zellpellet gelöst und in die Zellkulturflasche überführt, welche in den CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gelegt wurde.

### **2.2.5 Zellzählung**

Material:

- FALCON-Röhrchen mit Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231
- PBS
- Trypanblau
- Ethanol 90%
- Well-Platte
- Zählkammer Neubauer improved
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Mikroskop

Um die Zellen in der jeweiligen Zellkultur zählen zu können, mussten diese zuerst angefärbt werden. Hierfür wurden zuerst 50 µl PBS in ein Well pipettiert und dann mit 25 µl Trypanblau ergänzt. Das FALCON mit der Zellkultur wurde aufgeschüttelt und anschließend 25µl der Zellkultur zu der PBS/Trypanblau-Mischung hinzugegeben. Die Zählkammer wurde aus der Verpackung genommen und die Deckplatte aufgelegt. Dann wurden 25 µl der Trypanblau/Zellen-Mischung an den Rand des Deckglases pipettiert und durch die Kapillarkraft unter das Deckglas gezogen. Die so befüllte Zählkammer wurde unter ein Lichtmikroskop gelegt und der entsprechende Bereich scharf gestellt. Zur Bestimmung der Tumorzellzahl wurden die 25 Gruppenquadrate der Zählkammer ausgezählt, wobei die Tumorzellen durch den blauen Randsaum zu identifizieren waren. Aus der gezählten Zellzahl wurde der Mittelwert pro Quadrat errechnet, dieser aufgrund der Verdünnung mit 4 multipliziert und dann wiederum aufgrund des Volumens eines Quadrates von 0,1 mm<sup>3</sup> mit 10 multipliziert um die Zellzahl pro Mikroliter zu errechnen ( $\text{Tumorzellzahl}/\mu\text{l} = (\text{gezählte Tumorzellzahl}/25) \times 4 \times 10$ ). Waren sehr viele Zellen vorhanden oder bestand eine sehr regelmäßige Verteilung, wurden nur die 4 Eckquadrate ausgezählt und die gezählte Anzahl der Tumorzellen mit 10 multipliziert um die Zellzahl pro Mikroliter zu erhalten ( $\text{Tumorzellzahl}/\mu\text{l} = (\text{gezählte Tumorzellzahl}/4) \times 10$ ). Im Anschluss konnte die benötigte Menge an Zellsuspension für die Spiking-Experimente berechnet werden.



## 2.3 Patientenproben

Für die Patientenproben wurden bereits gesammelte Blutproben verwendet. Diese waren nach positivem Ethikvotum und schriftlicher Zustimmung der Patientinnen in der Frauenklinik der LMU München Innenstadt in den Jahren 2010 bis 2013 gesammelt und eingefroren worden. Als Patientenproben dieser Arbeit dienten 111 Proben von Patientinnen mit Mammakarzinom. Im Folgenden werden die Patientinnen mit Alter, TNM-Klassifikation, Grading, Histologie des Tumors, Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)- Rezeptorstatus, sowie HER-2-Status und menopausalem Status aufgeführt. Für diese Arbeit wurden die Patientinnen primär nach dem Grading und dem Fernmetastasenstatus unterschieden, woraus sich vier Patientengruppen ergaben. Hierbei wurden je 21 Blutproben von Patientinnen mit G1-Tumoren (vgl. Tab. 5) und G3-Tumoren (vgl. Tab. 7), 55 von G2-Tumor-Patientinnen (vgl. Tab. 6) und 14 Blutproben von metastasierten (M1) Patientinnen mit unterschiedlichem Grading (vgl. Tab. 8) untersucht.

Nr.	Alter	T	N	M	Histologie	ER	PR	HER-2	Menopausen-Status
1	72	cT1b	pNx	pMx	NST	90%	80%	Negativ	Postmenopausal
2	62	pT1b	pN0	pMx	NST, DCIS	80%	60%	Negativ	Postmenopausal
3	70	pT1b	pN0	pMx	NST	100%	25%	Negativ	Fehlt
4	50	pT1b	pN0	pMx	NST, DCIS	80%	95%	Negativ	Prämenopausal
5	43	pT1b	pN0	pMx	Invasiv lobulär	99%	99%	Negativ	Prämenopausal
6	50	pT1b/c	pN0	pMx	NST beidseitig	90%	90%	Negativ	Fehlt
7	60	pT1c	pN0	pM0	kribriiform	98%	95%	Negativ	Postmenopausal
8	52	pT1c	pN0	pMx	NST	99%	99%	Negativ	Klimakterium
9	66	pT1c	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
10	73	pT1c	pN0	pM0	NST	99%	99%	Negativ	Postmenopausal
11	54	pT1c	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Klimakterium
12	82	pT1c	pNx	pMx	NST, DCIS	90%	80%	Negativ	Postmenopausal
13	49	pT1c	pN0	pMx	Invasiv tubulär	80%	80%	Negativ	Fehlt
14	48	pT1c	pN0	pMx	NST	75%	75%	Negativ	Prämenopausal
15	42	pT1c	pN1	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
16	60	pT1c	pN0	pM0	NST	100%	100%	Negativ	Postmenopausal
17	41	pT2	pN0	pMx	NST	80%	50%	Negativ	Prämenopausal
18	56	pT2	pN0	pMx	NST	100%	0%	Negativ	Fehlt
19	72	pT2	pN1a	pM0	NST	90%	90%	Negativ	Postmenopausal
20	68	pT2	pN0	pM0	Invasiv lobulär	100%	100%	Negativ	Postmenopausal
21	72	pT3	pN0	pMx	Papillär	99%	99%	Negativ	Postmenopausal

**Tabelle 5: Patientendaten der G1-Tumore** mit Alter, TNM-Klassifikation, Histologischem Typ, Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, Her2- und Menopausenstatus

Nr.	Alter	T	N	M	Histologie	ER	PR	HER-2	Menopausen-Status
22	58	pT1b	pN1a	pMx	NST	100%	50%	Negativ	Postmenopausal
23	43	pT1b	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Prämenopausal
24	84	pT1b	pN1a	pM0	NST	90%	90%	Negativ	Fehlt
25	72	pT1c	pN0	pMx	NST	85%	60%	Negativ	Fehlt

26	62	pT1c	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
27	64	pT1c	pN1	pMx	NST	100%	70%	Negativ	Postmenopausal
28	53	pT1c	pN1a	pMx	NST	100%	80%	Negativ	Fehlt
29	70	pT1c	pN2	pM0	Invasiv lobulär	50%	50%	Negativ	Postmenopausal
30	70	pT1c	pN0	pMx	NST	50%	30%	Negativ	Postmenopausal
31	48	pT1c	pN0	pM0	NST	95%	95%	Negativ	Prämenopausal
32	50	pT1c	pN1a	pMx	NST, DCIS	99%	99%	Negativ	Fehlt
33	61	pT1c	pN0	pM0	NST	80%	70%	Negativ	Postmenopausal
34	48	pT1c	pN1a	pMx	NST, DCIS	99%	99%	Negativ	Klimakterium
35	49	pT1c	pN1	pM0	NST	100%	100%	Negativ	Prämenopausal
36	58	pT1c	pN0	pMx	NST	90%	90%	Negativ	Postmenopausal
37	50	pT1c	pN0	pMx	NST	70%	0%	Negativ	Prämenopausal
38	71	pT1c	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
39	51	pT1c	pN1a	pMx	Invasiv lobulär/ duktal	90%	90%	Negativ	Prämenopausal
40	46	pT1c	pN1a	pM0	Invasiv lobulär	60%	80%	Negativ	Prämenopausal
41	71	pT1c	pN0	pMx	NST	80%	80%	Negativ	Fehlt
42	52	pT2	pN1	pMx	NST	66%	100%	Negativ	Fehlt
43	65	pT2	pN1a	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
44	39	pT2	pN0	pM0	Invasiv lobulär	90%	70%	Negativ	Prämenopausal
45	60	pT2	pN0	pMx	Kribriform	90%	15%	Fehlt	Postmenopausal
46	49	pT2	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Nicht bekannt
47	66	pT2	pN0	pMx	NST	100%	75%	Negativ	Postmenopausal
48	73	pT2	pN0	pMx	NST	80%	80%	Negativ	Postmenopausal
49	70	pT2	pN0	pMx	NST	100%	100%	Positiv	Fehlt
50	52	pT2	pN0	pMx	NST	100%	75%	Negativ	Klimakterium
51	55	pT2	pN0	pM0	Invasiv metaplastisch	0%	0%	Negativ	Fehlt
52	63	pT2	pN0	pMx	Invasiv lobulär	99%	99%	Negativ	Postmenopausal
53	76	pT2	pN1a	pMx	Invasiv lobulär	100%	100%	Negativ	Postmenopausal
54	71	pT2	pN1	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
55	50	pT2	pN1	pM0	Invasiv lobulär	95%	95%	Negativ	Prämenopausal
56	49	pT2	pN1a	pMx	NST	80%	80%	Negativ	Prämenopausal
57	33	pT2	pN0	pMx	NST	99%	99%	Negativ	Fehlt
58	46	pT2	pN0	pMx	NST	100%	100%	Positiv	Fehlt
59	46	pT2	pN0	pMx	NST	100%	100%	Positiv	Fehlt
60	50	pT2	pN0	pMx	Invasiv lobulär	90%	90%	Negativ	Fehlt
61	69	pT2	pN1a	pM0	NST	99%	0%	Negativ	Postmenopausal
62	62	pT2	pN0	pMx	Invasiv lobulär	90%	80%	Negativ	Postmenopausal
63	73	pT2	pN0	fehlt	Invasiv lobulär	75%	80%	Negativ	Fehlt
64	71	pT2	pN0	pM0	NST	100%	33%	Negativ	Fehlt
65	62	pT2	pN0	pMx	NST	100%	80%	Negativ	Postmenopausal
66	74	pT3	pN0	pM0	NST, DCIS	90%	90%	Negativ	Postmenopausal
67	51	pT3	pN2a	pMx	Invasiv lobulär	90%	80%	Negativ	Fehlt

68	47	pT3	pN2a	pM0	Invasiv lobulär	66%	66%	Positiv	Prämenopausal
69	75	pT3	pN3a	pM0	Invasiv lobulär	100%	75%	Negativ	Fehlt
70	60	pT3	pN1a	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Postmenopausal
71	29	pT3	pN1	pMx	NST	70%	60%	Positiv	Fehlt
72	54	pT3	pN1a	pM0	Invasiv lobulär	99%	0%	Negativ	Postmenopausal
73	75	pT3	pN1a	pM0	Invasiv lobulär	81%	81%	Negativ	Postmenopausal
74	46	pT3	pN0	pM0	NST	80%	80%	Negativ	Postmenopausal
75	59	pT3	pN1a	pM0	NST, DCIS	33%	0%	Positiv	Fehlt
76	60	pT3	pN1a	pMx	NST, DCIS	100%	100%	Negativ	Postmenopausal

**Tabelle 6: Patientendaten der G2-Tumore** mit Alter, TNM-Klassifikation, Histologischen Typ, Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, Her2- und Menopausenstatus

Nr.	Alter	T	N	M	Histologie	ER	PR	HER-2	Menopausen-Status
77	82	pT1b	pN0	pMx	NST, DCIS	75%	0%	Positiv	Postmenopausal
78	67	pT1b	pN0	pMx	NST	95%	90%	Negativ	Postmenopausal
79	48	pT1b	pN0	pMx	NST	0%	0%	Negativ	Fehlt
80	65	pT1c	pN0	pMx	NST	85%	85%	Positiv	Fehlt
81	65	pT1c	pN1a	pMx	NST	100%	33%	Positiv	Fehlt
82	50	pT1c	pN0	pMx	NST	90%	100%	Negativ	Fehlt
83	39	pT1c	pN0	pMx	NST	80%	80%	Negativ	Prämenopausal
84	73	pT1c	pN0	pM0	NST	80%	80%	Negativ	Postmenopausal
85	35	pT1c	pN0	pMx	NST	10%	10%	Negativ	Prämenopausal
86	66	pT1c	pN0	pMx	NST	100%	100%	Negativ	Fehlt
87	52	pT1c	pN0	pMx	NST	75%	100%	Negativ	Fehlt
88	60	pT1c	pN0	pM0	NST	90%	90%	Negativ	Postmenopausal
89	52	pT1c	pN0	pM0	NST	0%	0%	Negativ	Postmenopausal
90	50	pT2	pN0	pM0	medullär	0%	0%	Negativ	Prämenopausal
91	61	pT2	pN1a	pM0	NST	33%	30%	Positiv	Postmenopausal
92	65	pT2	pN1	pM0	NST	99%	15%	Negativ	Postmenopausal
93	71	pT2	pN0	pM0	NST	60%	15%	Positiv	Postmenopausal
94	69	pT2	pN0	pMx	NST	8%	0%	Negativ	Postmenopausal
95	74	pT3	pN3a	pMx	Nicht bekannt	80%	80%	Negativ	Fehlt
96	42	pT3	pN0	pMx	NST	80%	0%	Negativ	Prämenopausal
97	59	pT3	pN0	pM0	Invasiv medullär	0%	0%	Negativ	Postmenopausal

**Tabelle 7: Patientendaten der G3-Tumore** mit Alter, TNM-Klassifikation, Histologischem Typ, Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, Her2- und Menopausenstatus

Nr.	Alter	T	N	Metastasen	Histologie und Grading	ER	PR	HER-2	Menopausen-Status
98	57	pT4b	pN2a	Fehlt	NST; G3	0%	0%	Neg.	Fehlt
99	31	pT2	pN0	Leber	NST; G3	0%	0%	Neg.	Fehlt
100	54	pT1c	pN0	Knochen	NST; G3	Fehlt	Fehlt	Neg.	Postmenopausal

<b>101</b>	39	pT3	pN2a	Lunge, Leber, Knochen	NST; G3	0%	0%	Pos.	Fehlt
<b>102</b>	66	pT4b	pN1	Knochen	NST; G2	99%	99%	Neg.	Postmenopausal
<b>103</b>	55	pT1c	pN0	Leber, Knochen	NST; G3	Fehlt	Fehlt	Neg.	Postmenopausal
<b>104</b>	84	pT1b	pN1	Leber	Invasiv lobulär; G fehlt	70%	80%	Neg.	Postmenopausal
<b>105</b>	59	pT4b	pN2a	Knochen	NST; G2	90%	90%	Pos.	Postmenopausal
<b>106</b>	76	pT3	pN1a	Lunge, Leber	NST; G3	90%	40%	Neg.	Postmenopausal
<b>107</b>	56	pT2	pN3c	Lunge, Leber, Knochen	NST, DCIS; G2	90%	20%	Neg.	Postmenopausal
<b>108</b>	75	pyT3	pN1a	Lunge, Leber, Knochen	NST; G2	99%	0%	Neg.	Postmenopausal
<b>109</b>	47	yT1a	pN2a	Hirn, Lunge, Knochen	NST; G2	0%	0%	Pos.	Postmenopausal
<b>110</b>	44	pT2	pN0	Haut, Lunge, Knochen	NST; G3	100%	15%	Neg.	Fehlt
<b>111</b>	61	pT2	pN2a	Knochen	NST, DCIS; G2	60%	10%	Neg.	Postmenopausal

**Tabelle 8: Patientendaten der metastasierten Tumore** mit Alter, TN-Klassifikation, Lokalisation der Fernmetastasen, Grading und Histologischem Typ, sowie Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, Her2- und Menopausenstatus

## **2.4 Methodisches Vorgehen**

### ***2.4.1 Spiking-Experimente***

Als Vorversuche wurde das sogenannte Spiking durchgeführt. Hierbei wurde das Blut gesunder Spenderinnen mit einer durch Zellzählung (vgl. Kapitel 2.2.4) genau bestimmten Anzahl an Tumorzellen versehen. Die isolierten Tumorzellen wurden am Tag 1 der RNA-Extraktion (vgl. Kapitel 2.2.2) zum Leukozytenpellet hinzugefügt. Hierbei wurden einer Probe keine Tumorzellen zugefügt, um diese als Negativprobe verwenden zu können. Die anderen Proben wurden mit je 10, 100 und 1000 Zellen pro Milliliter versehen. Nach dem Zufügen der Tumorzellen wurde die RNA wie unter Kapitel 2.1.2.1 bis 2.1.2.3 beschrieben weiter vorgegangen. Durch das Spiken wurde es möglich, mit Hilfe der RT-PCR eine Beziehung zwischen festgelegter Tumorzellzahl pro Milliliter und Expression der gemessenen Genmarker festzustellen. Bei einem Anstieg des Markers bei steigender Zellmenge wurde dieser als brauchbar bewertet und auf die Patientenproben übertragen (vgl. Kapitel 2.4.2).

### ***2.4.2 Übertragung auf Patientenproben***

Die in Kapitel 2.1.2.3 beschriebene Methode zur cDNA-Umschreibung sowie die Genquantifizierung mittels RT-PCR wurden im Anschluss an die unter Kapitel 2.4.1 beschriebenen Vorversuche an den 111 Patientenproben durchgeführt. Eine Extraktion der RNA war aufgrund der bereits vorliegenden RNA-Proben nicht notwendig. Es wurden jedoch für die RT-PCR Negativproben zur Kontrolle benötigt. Hierfür wurde wie oben beschrieben die RNA aus Blutproben 14 gesunder Probandinnen extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Für die RT-PCR wurden aufgrund der Vorversuche (vgl. Kapitel 3.1) 18s als Referenzgen sowie CK19, Snail, FoxC2 und Twist als Tumormarker ausgewählt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Spiking-Experimente

##### 3.1.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten RNAs

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben wurde als Vorversuch zur Testung der möglichen Gene das sogenannte Spiking verwendet. Hierbei wurden dem Vollblut gesunder Spenderinnen künstlich eine Mischung aus Tumorzellen aus den Brustkrebs-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 hinzugefügt. Es wurde stets darauf geachtet eine Negativprobe ohne zugefügte Tumorzellen und Proben mit jeweils 10, 100 und 1000 Tumorzellen pro Milliliter zu untersuchen. Die Zugabe der Tumorzellen erfolgte am Tag 1 der RNA-Extraktion mit Trizol (vgl. Kapitel 2.1.2 und 2.4.1). Hierbei wurden je 2 Blutproben pro Zellzahl mit den Tumorzellen wie folgt versehen (vgl. Tab. 9):

Spiking für Versuch 1		
Zellzahl (n/ml)	MCF-7 in $\mu\text{l}$	MDA-MB-231 in $\mu\text{l}$
10	7,5 $\mu\text{l}$ bei 11 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$	3,75 $\mu\text{l}$ bei 21 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$
100	75 $\mu\text{l}$ bei 11 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$	37,5 $\mu\text{l}$ bei 21 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$
1000	1250 $\mu\text{l}$ bei 6 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$	614 $\mu\text{l}$ bei 18 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$
Spiking für Versuch 2		
Zellzahl (n/ml)	MCF-7 in $\mu\text{l}$	MDA-MB-231 in $\mu\text{l}$
10	2,59 $\mu\text{l}$ bei 29 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$	6,82 $\mu\text{l}$ bei 11 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$
100	25,9 $\mu\text{l}$ bei 29 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$	68,2 $\mu\text{l}$ bei 11 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$
1000	259 $\mu\text{l}$ bei 29 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$	682 $\mu\text{l}$ bei 11 Tumorzellen/ $\mu\text{l}$

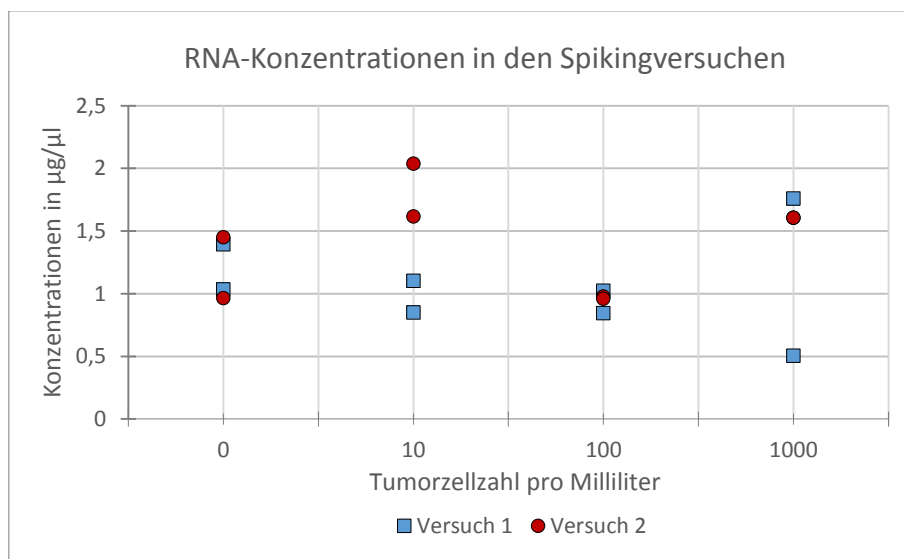
**Tabelle 9: Anzahl der Tumorzellen für das Spiking** aufgeteilt in die jeweils benötigte Mikrolitermenge der Zellkulturen MCF-7 und MDA-MB-231 für Versuch 1 und Versuch 2

Die extrahierten RNAs wurden mit Hilfe eines Nanophotometers auf ihre Konzentrationen und Ratios untersucht. Hierbei musste durch eine passende Konzentration gewährleistet sein, dass genügend RNA für die als nächsten Schritt folgende Umschreibung zur cDNA vorhanden war. Proben, bei denen das nicht der Fall war, wurden verworfen. Die Ratio (A260/280) sollte bei der Messung stets zwischen 1,7 und 2,0 liegen, um die nötige Reinheit der RNA zu gewährleisten. Die notwendige Konzentration und Reinheit zur Umschreibung besaßen 16 RNA-Proben, womit 2 PCR-Platten (Versuch 1 und Versuch 2) bestückt werden konnten. Die gemessenen Ratio- und Konzentrations-Werte sind in Tabelle 10, sowie in Abbildung 10 und Abbildung 11 dargestellt:

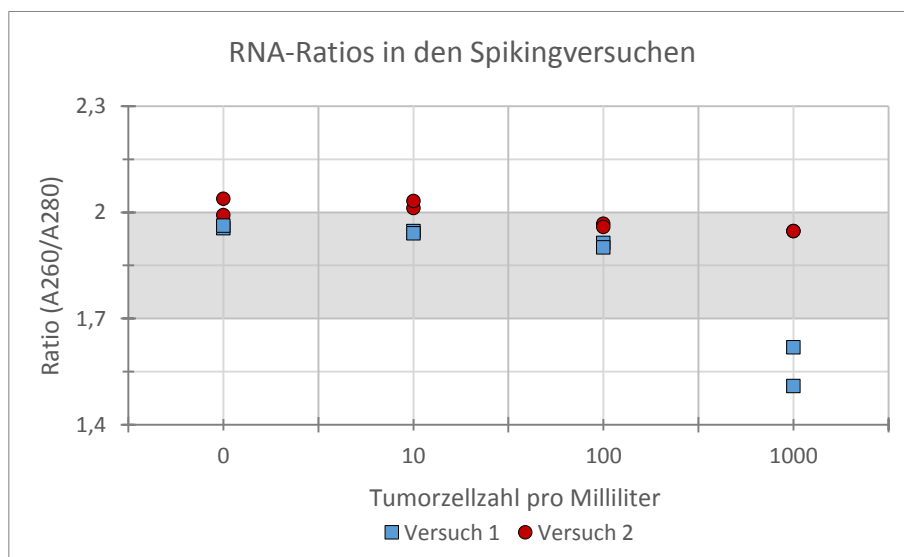
Spiking für Versuch 1		
Zellzahl (n/ml)	Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Ratio (A260/A280)
0	1,032	1,955
0	1,394	1,963
10	1,102	1,947
10	0,85	1,941
100	1,022	1,914
100	0,844	1,901
1000	1,758	1,619
1000	0,504	1,509

Spiking für Versuch 2		
Zellzahl (n/ml)	Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Ratio (A260/A280)
0	0,964	1,992
0	1,448	2,039
10	2,036	2,012
10	1,616	2,032
100	0,976	1,968
100	0,96	1,959
1000	1,604	1,947
1000	0,638	1,957

**Tabelle 10: Konzentrationen und Ratios der gespiketen RNA-Proben für Versuch 1 und Versuch 2 bei jeweils 0 Tumorzellen/ml, 10 Tumorzellen/ml, 100 Tumorzellen/ml und 1000 Tumorzellen/ml**



**Abbildung 10: RNA-Konzentrationen in den Spikingversuchen:** Die blauen Kästchen repräsentieren hierbei die in Versuch 1 gemessenen und die roten Punkte die in Versuch 2 gemessenen Konzentrationswerte in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  unter der Zugabe von je 0 Tumorzellen/ml, 10 Tumorzellen/ml, 100 Tumorzellen/ml und 1000 Tumorzellen/ml



**Abbildung 11: RNA-Ratios in den Spikingversuchen:** Auf der y-Achse werden die gemessenen Ratios im Bereich zwischen 1,4 und 2,0 dargestellt, an der x-Achse sind die Tumorzellen pro Milliliter angetragen. Die blauen Kästchen repräsentieren die in Versuch 1 gemessenen, die roten Punkte die in Versuch 2 gemessenen Werte. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Optimalbereich der Ratios zwischen 1,7 und 2,0 dar.

### 3.1.2 Werte der Genexpression aus der RT-PCR

Nach der Konzentrationsmessung erfolgte mit Hilfe der reversen Transkription die Umschreibung der RNA in cDNA. Dabei wurden jeweils die beiden Proben mit der derselben Tumorzellkonzentration (z.B. 10/ml) bzw. die beiden Nullproben zusammengeführt, um eine einheitliche DNA zum Einsetzen in die RT-PCR zu erhalten. Mit der Echtzeit-PCR konnten nun die Ct-Werte ermittelt werden, aus denen die relative Quantifizierung (RQ) berechnet werden konnte. Die RQ diente hierbei als Maß für die Expression der Markergene.

Ein geeignetes Markergen sollte mit ansteigender Tumorzellzahl eine Verringerung des Ct-Wertes und einen Anstieg des RQ-Wertes zeigen. Die Abnahme des Ct-Wertes zeigt an, dass der Schwellenwert für den Nachweis früher erreicht und somit das Gen in höhere Menge exprimiert wird. Der RQ-Wert sollte stets Werte >1 und damit eine höhere Genexpression als in der Nullprobe anzeigen.

In den Spiking-Proben wurde 18s als Housekeeping-Gen und Referenzwert verwendet. Die folgende Tabelle zeigt die Ct-Werte für 18s (vgl. Tab. 11).

Spiking Versuch 1: Referenzgen 18s		Spiking Versuch 2: Referenzgen 18s	
Zellzahl (n/ml)	Ct	Zellzahl (n/ml)	Ct
0	14.601	0	14.622
0	14.369	0	14.603
10	14.903	10	14.697
10	14.869	10	15.000
100	15.393	100	15.242
100	15.313	100	15.154
1000	16.924	1000	14.138
1000	17.000	1000	14.209

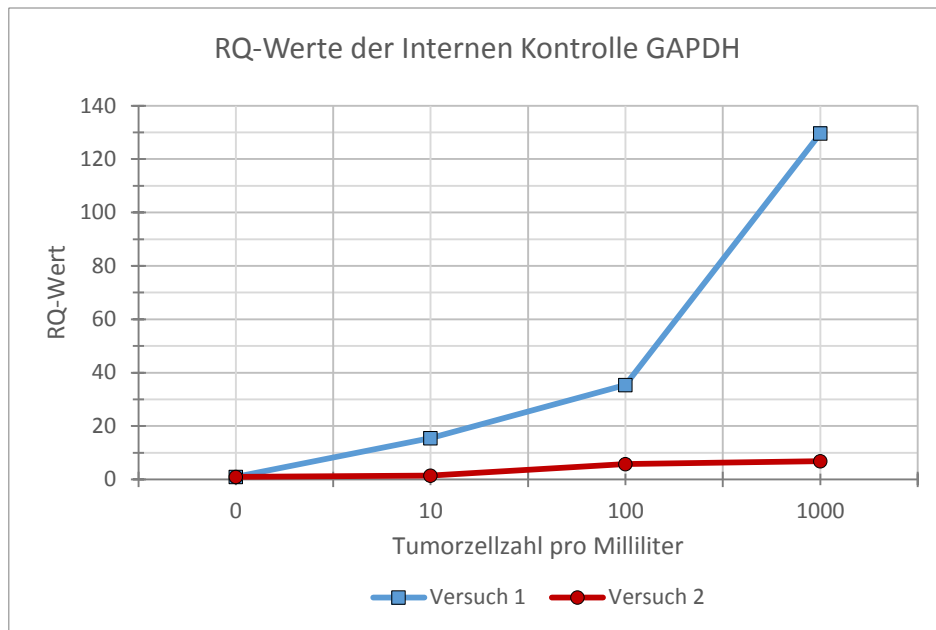
**Tabelle 11: Ct-Werte der RT-PCR für 18s in den Spiking Versuchen**, wobei sich die Werte in versuch 1 zwischen 14.369 und 17.000 und in Versuch 2 zwischen 14.603 und 15.242 befanden

Im Rahmen der Spiking-Vorversuche wurde zudem GAPDH mit überprüft. Es diente hierbei als interne Kontrolle für die Funktionalität der RT-PCR. Nach erfolgreichem Funktionalitätsnachweis durch ansteigende RQ-Werte (vgl. Abb. 12) und abnehmende Ct-Werte bei ansteigender Tumorzellzahl, wurde bei den Patientenproben auf eine weitere Nutzung von GAPDH verzichtet. Tabelle 12 zeigt die Ct- und RQ-Werte für GAPDH:

Spiking Versuch 1: GAPDH			Spiking Versuch 2: GAPDH		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ	Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	1.000	0	23.793	1.000
0	24.000	1.000	0	23.935	1.000
10	21.180	15.536	10	23.498	1.465
10	19.707	15.536	10	23.599	1.465
100	20.709	35.389	100	22.000	5.736
100	18.739	35.389	100	21.858	5.736
1000	19.810	129.597	1000	20.657	6.912
1000	19.109	129.597	1000	20.615	6.912

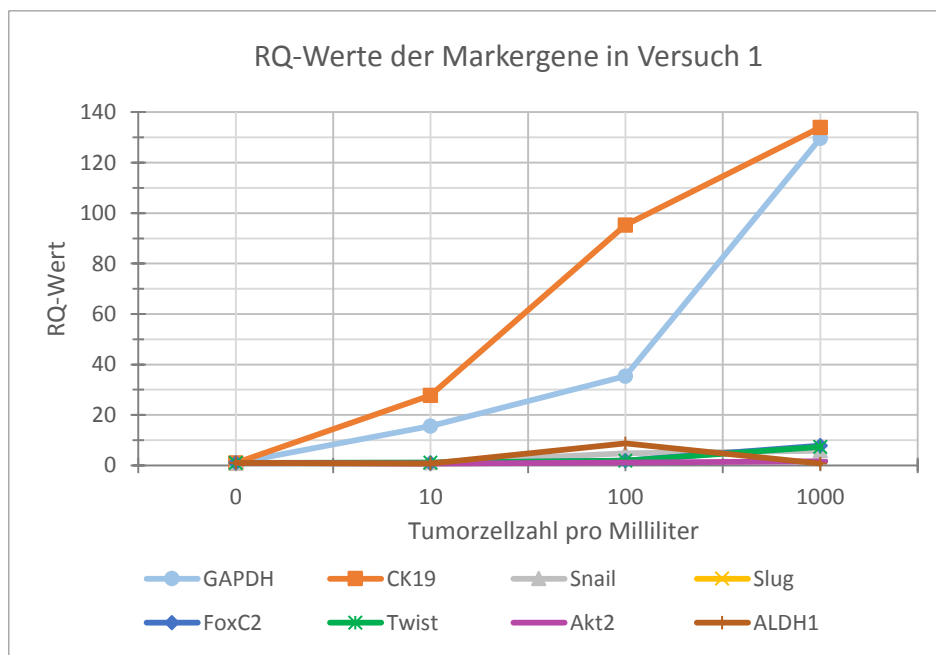
**Tabelle 12: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für GAPDH in den Spiking-Versuchen:** Bei ansteigenden RQ-Werten, welche zwischen 1.000 und 129.597 für Versuch 1 und 1.000 und 6.912 für Versuch 2 liegen, nehmen die Ct-Werte ab.



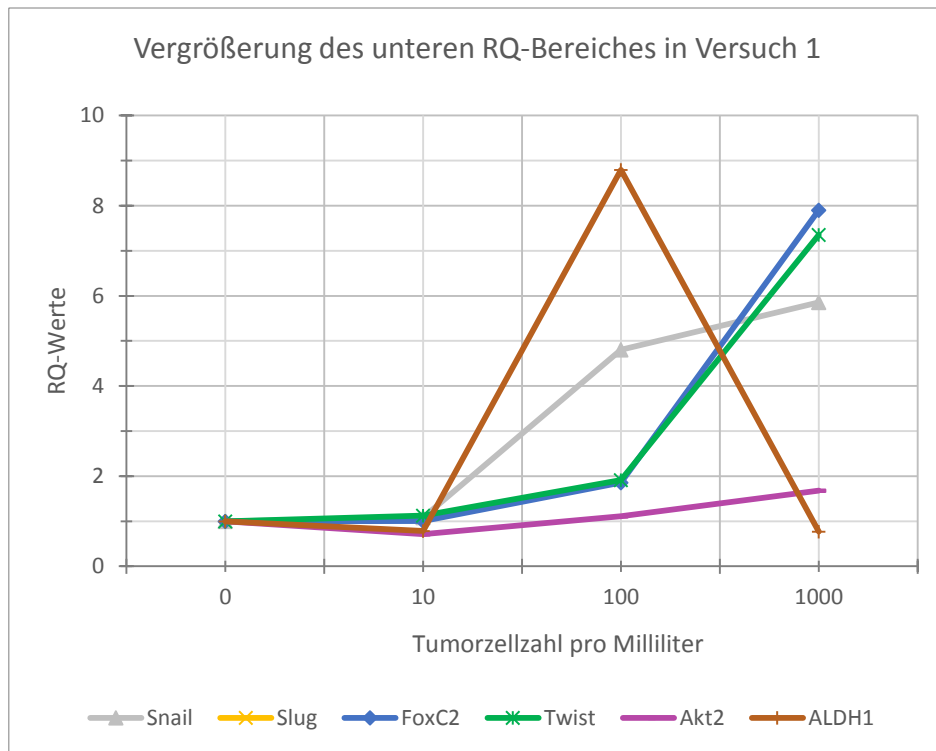


**Abbildung 12: RQ-Werte von GAPDH:** Antragung der RQ-Werte an der y-Achse und der Anzahl der Tumorzellen auf der x-Achse. Der blaue Graph repräsentiert Versuch 1, wohingegen der rote Graph Versuch 2 darstellt.

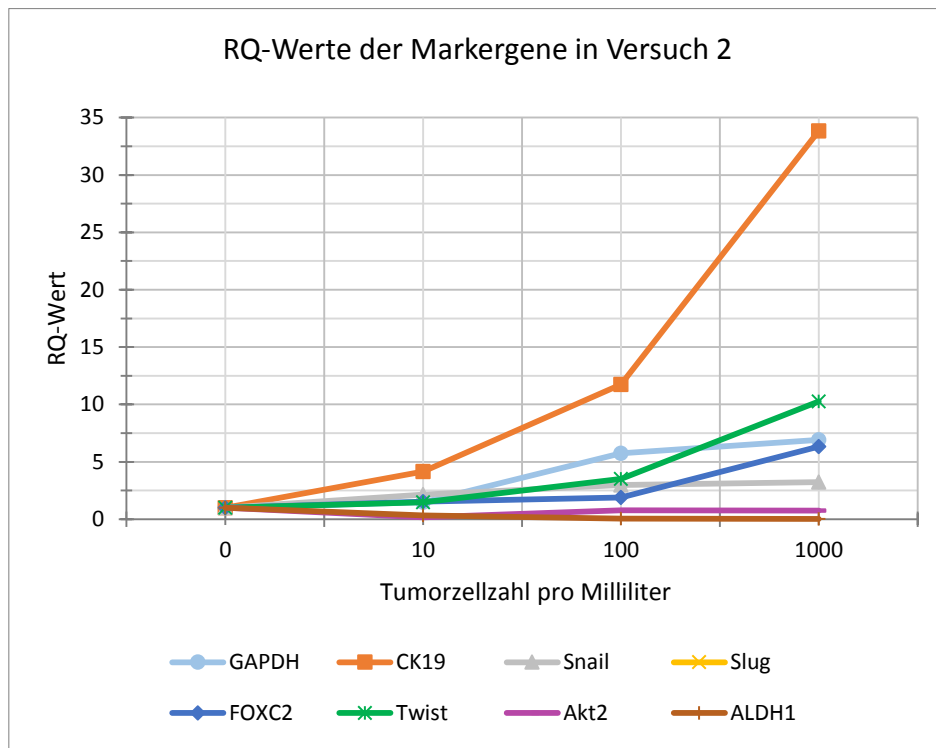
Im Folgenden werden die im Spiking gemessenen Ct- und RQ-Werte für die Marker CK19, Snail, Slug, FoxC2, Twist, Akt2 und ALDH1 dargestellt. Für die später bei den Patientenproben verwendeten Markergene CK19, Snail, FoxC2 und Twist wurde jeweils eine Amplifikationskurve eines Versuches mit Hilfe der PCR-Software erstellt. Basierend auf den RQ-Werten wurde zudem eine grafische Darstellung des Genexpressionsanstiegs angefertigt, sofern dieser kontinuierlich war. Da die Schwankungsbreite der RQ-Werte mit Maximalwerten zwischen 3.233 und 133.909 sehr groß war, sind die genspezifischen Grafiken unterschiedlich skaliert, um den Anstieg der einzelnen Kurven zu zeigen. Abb. 13 zeigt eine Gesamtübersicht der ermittelten RQ-Werte, wobei Abb. 14 eine Vergrößerung des unteren Bereiches (RQ-Werte kleiner 10) darstellt. Abb. 15 stellt die ermittelten RQ-Werte aller Gene in Versuch 1 Versuch 2 dar.



**Abbildung 13: RQ-Werte der RT-PCR im Spiking-Versuch 1:** Auftragung der RQ-Werte auf der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter auf der x-Achse, sowie Darstellung des Kurvenverlaufes der RQ-Werte aller getesteten Markergene.



**Abbildung 14: Vergrößerung des unteren RQ-Bereiches im Rahmen von Versuch 1:** Antragung der RQ-Werte an der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter an der x-Achse, sowie vergrößerte Darstellung der Kurven mit RQ-Werten kleiner 10 aus Abb. 13



**Abbildung 15: RQ-Werte der RT-PCR im Spiking-Versuch 2:** Auftragung der RQ-Werte auf der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter auf der x-Achse, sowie Darstellung des Kurvenverlaufes der RQ-Werte aller getesteten Markergene.

### 3.1.2.1 Ergebnisse für CK19

Für CK19 zeigte sich in beiden Spikingversuchen ein kontinuierlicher Anstieg der Genexpression mit Zunahme der Zellzahl pro Milliliter. Die Zunahme der Genexpression war bei diesem Marker mit RQ-

Werten von bis zu 133 am stärksten ausgeprägt. In der Amplifikationskurve (vgl. Abb. 16) stellt sich die Abnahme der Ct-Werte mit Erhöhung der Tumorzellzahl durch eine Verschiebung der Kurven nach links graphisch dar.

Tabelle 13 zeigt die gemessenen Ct- und RQ-Werte für die beiden Versuche. Für den Anstieg der relativen Quantifizierung als Zunahme der Genexpression wurde eine Kurve erstellt (vgl. Abb. 17). Diese verdeutlicht den größten Expressionsanstieg des Markers bei einer Zugabe von 100 Tumorzellen/ml bei Versuch 1 mit einem RQ-Sprung von 27,723 auf 95,207, sowie einen – wenn auch geringeren – Expressionsanstieg unter Zugabe von 1000 Tumorzellen/ml in Versuch 2 mit einem Anstieg des RQ-Wertes von 11,735 auf 33,830.

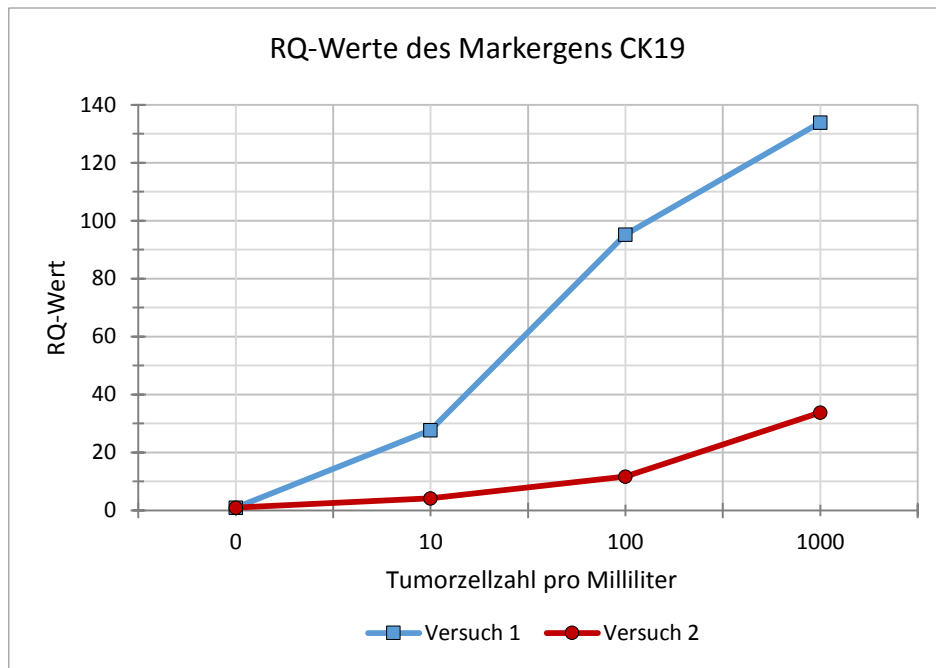


**Abbildung 16: Amplifikationskurve für CK19:** Kennzeichnung des Ct-Wertes durch die grüne Linie mit progredienter Linksverschiebung der Kurven bei zunehmender Tumorzellzahl pro Milliliter (blaue Kurve = 0 Tumorzellen/ml, grüne Kurve = 10 Tumorzellen/ml, graue Kurve = 100 Tumorzellen/ml und orange Linie = 1000 Tumorzellen/ml), sowie minimalen Fluoreszenznachweisen bei niedrigen Amplifikationszahlen

Spiking Versuch 1: CK19		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	30.950	1.000
0	31.000	1.000
10	26.016	27.723
10	27.150	27.723
100	24.598	95.207
100	25.942	95.207
1000	24.402	133.909
1000	25.253	133.909

Spiking Versuch 2: CK19		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	28.833	1.000
0	28.987	1.000
10	26.991	4.146
10	27.197	4.146
100	25.885	11.735
100	26.000	11.735
1000	23.252	33.830
1000	23.530	33.830

**Tabelle 13: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für CK19 in den Spiking-Versuchen:** Abnahme der Ct-Werte bei ansteigenden RQ-Werten zwischen 1.000 und 133.909 für Versuch 1 und 1.000 und 22.830 bei Versuch 2



**Abbildung 17: RQ-Werte von CK19:** Antragung der RQ-Werte an der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter an der x-Achse. Der blaue Graph stellt die Werte aus Versuch 1, der rote Graph die Werte aus Versuch 2 dar.

### 3.1.2.2 Ergebnisse für Snail

In der Amplifikationskurve von Snail zeigt sich eine geringe, jedoch vorhandene Abnahme der Ct-Werte mit nur geringer Linksverlagerung bei ansteigender Tumorzellzahl (vgl. Abb. 18). Auch der Marker Snail zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Genexpression mit RQ-Werten, die stets größer als 1 waren, und Ct-Werten, die mit höherer Tumorzellzahl abnahmen (vgl. Tab. 14). Die Kurven für die Genexpression (vgl. Abb. 19) in beiden Versuchen zeigen einen progredienten Anstieg bei höheren Tumorzellzahlen pro Milliliter. Der steilste Anstieg ergibt sich dabei in Versuch 1 bei Erhöhung der Tumorzellkonzentration von 10 Tumorzellen/ml auf 100 Tumorzellen/ml mit einem RQ-Sprung von 1,084 auf 4,803.

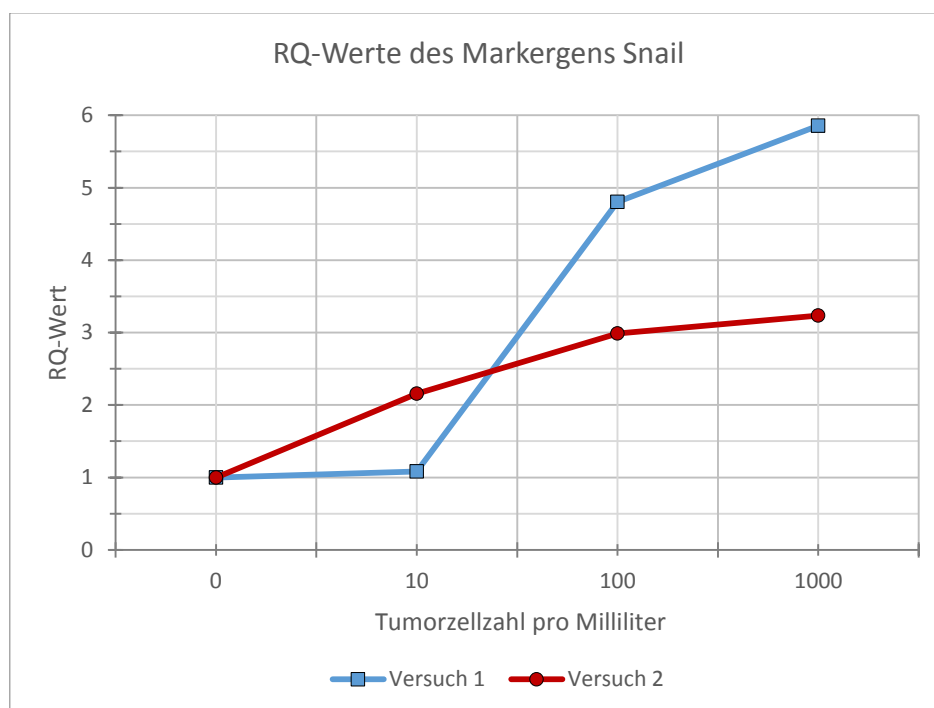


**Abbildung 18: Amplifikationskurve für Snail:** Verdeutlichung des Threshold-Cycle mittels der grünen Linie und Darstellung der Fluoreszenzkurven mit progredienter Linksverschiebung bei Erhöhung der Tumorzellzahl, sowie Nachweis geringgradiger Fluoreszenzwerte nach wenigen Amplifikationszyklen.

Spiking Versuch 1: Marker Snail		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	34.139	1.000
0	34.125	1.000
10	33.834	1.084
10	35.000	1.084
100	32.843	4.803
100	32.628	4.803
1000	32.398	5.855
1000	32.503	5.855

Spiking Versuch 2: Marker Snail		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	34.548	1.000
0	34.305	1.000
10	33.807	2.156
10	34.000	2.156
100	33.150	2.988
100	33.017	2.988
1000	31.984	3.233
1000	32.606	3.233

**Tabelle 14: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Snail in den Spiking-Versuchen:** Abnahme der Ct-Werte bei geringgradigem Anstieg der RQ-Werte in Versuch 1 von 1.000 auf 5.855 und in Versuch 2 von 1.000 auf 3.233



**Abbildung 19: RQ-Werte von Snail:** Antragung der RQ-Werte an der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter an der x-Achse. Der blaue Graph stellt die Werte aus Versuch 1, der rote Graph die Werte aus Versuch 2 dar.

### 3.1.2.3 Ergebnisse für Slug

Für den Marker Slug war bei beiden Versuchen keine Detektion der Nullprobe möglich. Somit konnte auch keine Berechnung und grafische Darstellung der RQ-Werte erfolgen. Die Abkürzung „undet.“ In Tabelle 15 steht hierbei für undetermined (engl. unbestimmt) und zeigt die fehlende Detektierbarkeit an. Bei Versuch 2 zeigte sich eine Abnahme der Ct-Werte bei Erhöhung der Tumorzellkonzentration von 10 Tumorzellen/ml (Ct-Wert: 37.679) auf 1000 Tumorzellen/ml (Ct-Wert: 28.920). Bei Versuch 1 blieben die Ct-Werte mit steigender Tumorzellzahl eher konstant oder zeigten unter Zugabe von 1000 Tumorzellen/ml sogar einen Anstieg.

Spiking Versuch 1: Marker Slug		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	
0	Undet.	
10	33.524	
10	34.000	
100	33.794	
100	33.629	
1000	34.396	
1000	34.991	

Spiking Versuch 2: Marker Slug		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	Undet.	
0	Undet.	
10	37.679	
10	36.000	
100	30.295	
100	30.290	
1000	29.634	
1000	28.920	

**Tabelle 15: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Slug in den Spiking-Versuchen:** Eine fehlende Detektierbarkeit der Nullprobe machte die Berechnung der RQ-Werte unmöglich.

### 3.1.2.4 Ergebnisse für FoxC2

FoxC2 zeigte allenfalls eine geringe Abnahme der Ct-Werte, was sich in der Amplifikationskurve (vgl. Abb. 20) durch eine fast nicht sichtbare Rechtsverschiebung darstellt. Dennoch zeigte der Marker FoxC2 einen geringfügigen, aber konstanten Anstieg der Genexpression (vgl. Tab. 16) mit zunehmenden RQ-Werten. Die Kurve der RQ-Werte für diesen Marker (vgl. Abb. 21) hat den steilsten Anstieg in beiden Versuchen bei Zunahme der Tumorzellkonzentration auf 1000 Tumorzellen/ml. In Versuch 1 stieg RQ hierbei von 1,856 auf 7,901 und in Versuch 2 von 1,897 auf 6,342.

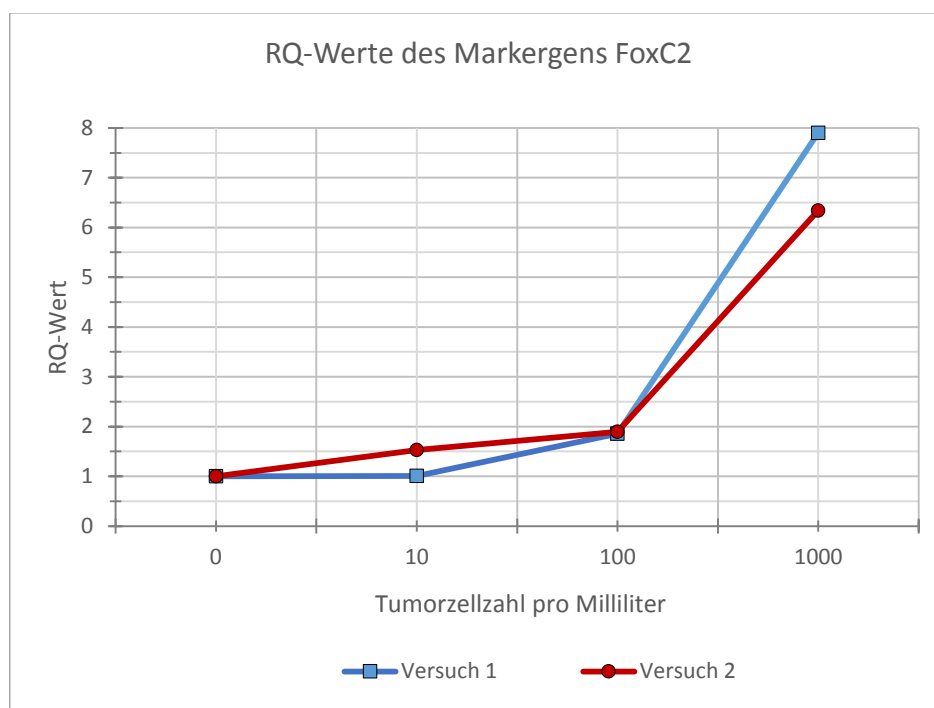


**Abbildung 20: Amplifikationskurve für FoxC2:** Verdeutlichung des Threshold-Cycle mittels der grünen Linie und Darstellung der Fluoreszenzkurven mit allerdings nur geringgradiger Linksverschiebung bei Erhöhung der Tumorzellzahl, sowie Nachweis geringgradiger Fluoreszenzwerte nach wenigen Amplifikationszyklen.

Spiking Versuch 1: Marker FoxC2		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	31.313	1.000
0	31.000	1.000
10	31.371	1.007
10	31.725	1.007
100	31.056	1.856
100	31.210	1.856
1000	30.514	7.901
1000	30.789	7.901

Spiking Versuch 2: Marker FoxC2		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	29.502	1.000
0	28.980	1.000
10	28.894	1.531
10	28.832	1.531
100	28.805	1.897
100	29.000	1.897
1000	26.089	6.342
1000	26.185	6.342

**Tabelle 16: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für FoxC2 in den Spiking-Versuchen:** Darstellung der abnehmenden Ct-Werte bei ansteigenden RQ-Werten für höhere Tumorzellzahlen.



**Abbildung 21: RQ-Werte von FoxC2:** Antragung der RQ-Werte auf der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter auf der x-Achse, sowie Darstellung von Versuch 1 (blauer Graph) und Versuch 2 (roter Graph) mit dem stärksten Anstieg unter Zugabe von 1000 Tumorzellen/ml.

### 3.1.2.5 Ergebnisse für Twist

Wie FoxC2 zeigte auch Twist in den Spikingversuchen nur eine geringfügige Rechtsverschiebung der Amplifikationskurve (vgl. Abb. 22) mit einem Ct-Durchgang, der stets in der Nähe des dreißigsten Amplifikationszyklus lag. Auch bei diesem Marker zeigte sich mit steigender Tumorzellzahl ein RQ-Anstieg bei geringfügig abnehmenden Ct-Werten (vgl. Tab. 17). Die RQ-Werten sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Die stärkste Zunahme der Genexpression zeigte sich auch hier bei einer Konzentrationszunahme der Tumorzellen von 100/ml auf 1000/ml mit Zunahme des RQ-Wertes von 1,913 auf 7,351 in Versuch 1 und von 3,513 auf 10,267 in Versuch 2. Wie in Abbildung 23 dargestellt, ließ sich auch für diesen Marker eine ansteigende RQ-Wert-Kurve erstellen.

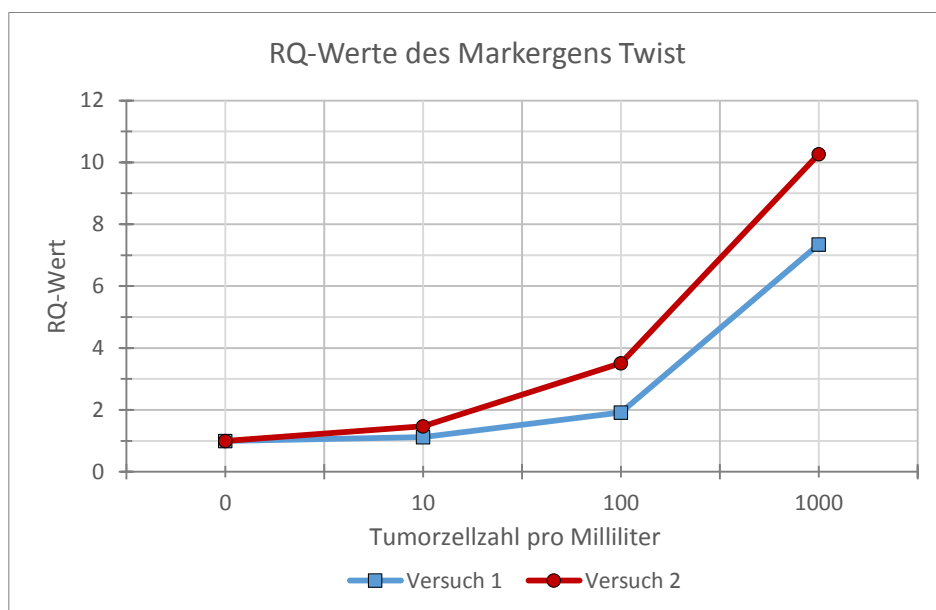


**Abbildung 22: Amplifikationskurve für Twist:** Darstellung des Threshold Cycle durch die grüne Linie, sowie der nahe beieinander liegenden Fluoreszenzkurven mit Ct-Werten zwischen 30 und 32. Nachweis geringgradiger Fluoreszenz bei niedrigen Amplifikationszyklen.

Spiking Versuch 1: Marker Twist		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	31.144	1.000
0	31.390	1.000
10	31.399	1.123
10	31.600	1.123
100	31.079	1.913
100	31.319	1.913
1000	30.793	7.351
1000	31.938	7.351

Spiking Versuch 2: Marker Twist		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	30.000	1.000
0	30.500	1.000
10	30.079	1.476
10	29.770	1.476
100	28.855	3.513
100	29.190	3.513
1000	26.505	10.267
1000	26.398	10.267

**Tabelle 17: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Twist in den Spiking-Versuchen:** Abnehmende Ct-Werte bei ansteigenden RQ-Werten unter Zugabe von höheren Tumorzellzahlen.



**Abbildung 23: RQ-Werte von Twist:** Antragung der RQ-Werte an der y-Achse und der Tumorzellzahl pro Milliliter an der x-Achse. Der blaue Graph stellt die Werte aus Versuch 1, der rote Graph die Werte aus Versuch 2 dar.



### 3.1.2.6 Ergebnisse für Akt 2

Für Akt 2 zeigten sich bei beiden Versuchen RQ-Werte kleiner als 1, wobei in Versuch 2 bei keiner Zellzahl eine erhöhte Genexpression detektiert werden konnte. In Versuch 1 zeigte sich bei einer Tumorzellkonzentration von 10/ml eine verminderte Genexpression, bei 100 bzw. 1000 Tumorzellen/ml jedoch ein Anstieg des RQ-Wertes auf bis zu 1,682. Die zugehörigen Ct- und RQ-Werte sind in Tabelle 18 angegeben.

Spiking Versuch 1: Marker Akt 2			Spiking Versuch 2: Marker Akt 2		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ	Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	28.819	1.000	0	29.000	1.000
0	28.510	1.000	0	29.250	1.000
10	29.417	0.716	10	31.843	0.176
10	29.678	0.716	10	31.884	0.176
100	29.363	1.110	100	30.118	0.771
100	29.401	1.110	100	30.054	0.771
1000	30.000	1.682	1000	29.010	0.763
1000	30.784	1.682	1000	29.143	0.763

**Tabelle 18: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Akt2 in den Spiking-Versuchen:** Darstellung ansteigender Ct-Werte in Versuch 1 bei nur in hohen Tumorzellzahlen erhöhter Genexpression, sowie der RQ-Werte <1 in Versuch 2.

### 3.1.2.7 Ergebnisse für ALDH 1

Auch bei ALDH 1 war kein konstanter Anstieg der Genexpression messbar. Für Versuch 1 zeigte sich sowohl eine Erhöhung als auch eine Verminderung der Genexpression, wohingegen Versuch 2 nur RQ-Werte kleiner als 1 zeigte. Die Ct-Werte zeigten ebenfalls keine konstante Abnahme (vgl. Tab. 19), sondern bei Versuch 2 sogar einen leichten Anstieg.

Spiking Versuch 1: Marker ALDH 1			Spiking Versuch 2: Marker ALDH 1		
Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ	Zellzahl (n/ml)	Ct	RQ
0	29.000	1.000	0	27.000	1.000
0	30.742	1.000	0	27.307	1.000
10	30.326	0.783	10	29.060	0.332
10	30.924	0.783	10	28.901	0.332
100	27.477	8.797	100	32.233	0.045
100	27.727	8.797	100	32.180	0.045
1000	32.908	0.768	1000	32.308	0.020
1000	32.549	0.768	1000	32.391	0.020

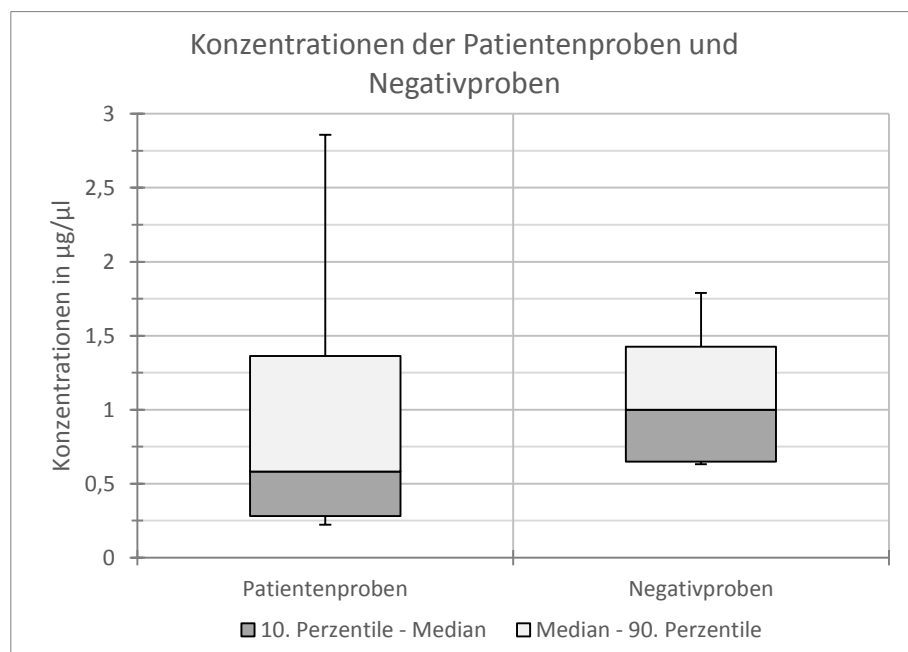
**Tabelle 19: Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für ALDH1 in den Spiking-Versuchen:** Darstellung der variablen Ct- und RQ-Werte in Versuch 1, sowie der ansteigenden Ct-Werte und abnehmenden RQ-Werte in Versuch 2

## 3.2 Ergebnisse der Patientenproben

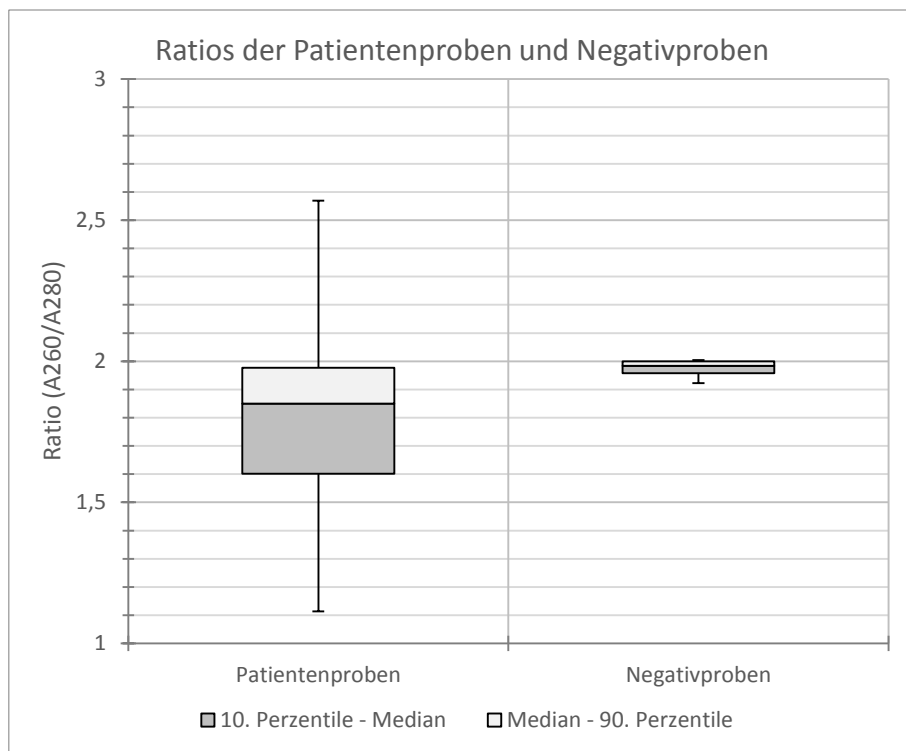
Nach den Vorversuchen erfolgte wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben die Übertragung der geeigneten Markergene CK19, Snail, FoxC2 und Twist auf die 111 Patientenproben und 14 Negativproben. Im Folgenden sollen die Konzentrationen und Ratios der RNAs, sowie die Genexpressionswerte der einzelnen Markergene für die Patientenproben dargestellt werden. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wird in den Tabellen 21 und 23 die Unterteilung der 111 Patientenproben in die 4 Gruppen der G1-, G2-, G3- und M1-Tumore mittels dicker Trennstriche zwischen den Gruppen dargestellt.

### 3.2.1 Konzentrationen und Ratios der extrahierten RNAs

Wie schon die RNA-Proben der Spiking-Versuche wurden auch die aus Patientenblut gewonnenen RNAs hinsichtlich ihrer Konzentration und Ratio untersucht. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich aus 14 Blutproben von gesunden Spenderinnen die RNA extrahiert und auch jeweils Konzentration und Ratio bestimmt. Nach der Messung der Patientenproben und Negativkontrollen erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA und anschließend die Verwendung in der RT-PCR. Der Ablauf der Versuche ähnelte dem der Spiking-Versuche, es wurde jedoch anstelle von gesundem Blut mit Tumorzellen unterschiedlicher Konzentration das reine Patientenblut und tumorzellfreies Blut gesunder Spenderinnen als Negativproben untersucht. Die folgenden Tabellen zeigen die Konzentrationen und Ratios der Patienten- (vgl. Tab. 20) und der Negativproben (vgl. Tab. 21). In Abbildung 24 sind die Konzentrationen und in Abbildung 25 die Ratios der Patienten- und Nullproben graphisch vergleichend dargestellt. Die Ratios der Negativproben bewegten sich hierbei mit einem Minimalwert von 1,922 und einem Maximalwert von 2,004 nahezu immer im geforderten Optimalbereich. Bei den Patientenproben lagen - mit dem Minimum bei 1,114 und dem Maximum 2,569 - einige Proben außerhalb des Maximalbereiches. Diese Abweichung wurde jedoch aufgrund der sehr eingeschränkten Probenverfügbarkeit toleriert.



**Abbildung 24: Box-Plot-Diagramm der Konzentrationen der Patientenproben und Negativproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.



**Abbildung 25: Box-Plot-Diagramm der Ratios der Patienten- und Negativproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der Ratios (A260/A280) auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.

Patientenproben		
Nr.	Konzentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Ratio (A260/A280)
1	1,076	1,964
2	0,518	1,850
3	0,580	1,737
4	0,678	1,971
5	0,536	1,956
6	0,596	1,560
7	0,626	1,755
8	0,640	1,893
9	0,724	1,508
10	0,366	1,968
11	1,594	2,003
12	0,282	1,905
13	0,343	1,986
14	0,560	1,750
15	0,582	1,830
16	0,334	2,569
17	0,406	1,678
18	0,250	1,543
19	1,426	2,008
20	0,324	1,862
21	1,044	1,970

22	1,410	1,875
23	0,504	1,813
24	0,486	1,869
25	0,294	1,615
26	0,438	1,872
27	1,012	1,977
28	0,274	1,557
29	1,476	1,859
30	0,842	1,977
31	0,654	1,946
32	0,264	1,913
33	1,362	1,863
34	0,926	1,905
35	0,258	1,866
36	0,390	1,789
37	0,594	1,768
38	0,354	1,654
39	1,598	1,988
40	0,418	1,866
41	0,546	1,796
42	0,282	1,808
43	0,222	1,708
44	0,310	1,703
45	0,602	1,929
46	0,688	1,755
47	0,618	1,907
48	2,858	2,013
49	0,712	1,590
50	0,666	1,970
51	1,004	1,685
52	0,678	1,430
53	0,288	1,516
54	1,082	1,785
55	0,394	1,827
56	0,322	1,865
57	1,142	1,976
58	0,612	1,800
59	0,250	2,115
60	0,324	1,670
61	0,732	1,787
62	1,028	1,996
63	0,460	1,655
64	0,628	1,754
65	1,428	1,597

66	0,528	1,941
67	0,382	1,891
68	0,292	1,763
69	0,400	1,942
70	0,530	1,606
71	0,468	1,733
72	0,262	1,871
73	0,534	1,757
74	0,648	2,077
75	0,266	1,602
76	0,630	1,853
77	1,380	2,023
78	0,246	1,708
79	0,472	1,802
80	0,360	1,837
81	0,278	1,853
82	1,248	1,738
83	0,470	1,324
84	0,336	1,697
85	0,862	1,950
86	0,364	1,685
87	0,602	1,905
88	0,598	1,801
89	0,830	1,766
90	0,448	1,114
91	0,948	1,662
92	1,160	1,973
93	0,778	1,888
94	0,346	1,730
95	0,312	1,696
96	1,442	1,892
97	0,558	1,924
98	1,950	1,966
99	0,894	1,910
100	0,538	1,758
101	0,442	1,768
102	0,742	1,490
103	0,694	1,846
104	0,490	1,828
105	1,074	1,858
106	0,640	1,916
107	1,244	1,956
108	1,650	1,941
109	1,086	1,786

<b>110</b>	0,562	1,925
<b>111</b>	0,832	1,944

**Tabelle 20: Konzentrationen in µg/µl und Ratios (A260/A280) der 111 Patientenproben:** Die breiten Striche stellen die Unterteilung gemäß der verschiedenen Tumoreigenschaften (G1-, G2-, G3-Grading und M1-Status) dar.

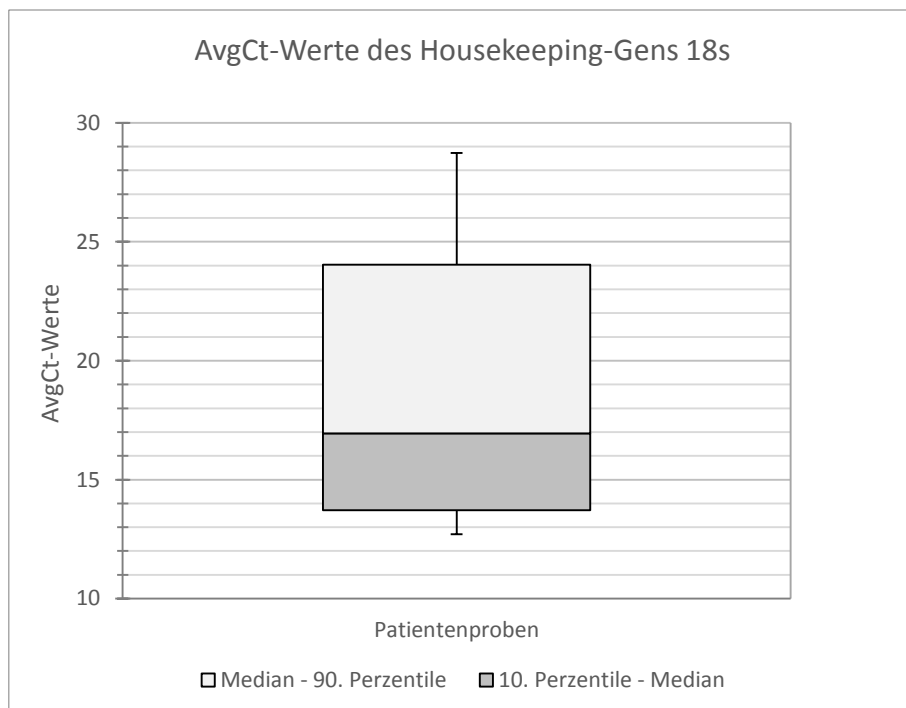
<b>Negativproben</b>		
<b>Nr.</b>	<b>Konzentration (µg/µl)</b>	<b>Ratio (A260/A280)</b>
<b>1</b>	0,632	1,963
<b>2</b>	0,654	1,958
<b>3</b>	1,790	2,004
<b>4</b>	1,450	1,992
<b>5</b>	0,926	1,987
<b>6</b>	0,986	1,988
<b>7</b>	1,018	1,981
<b>8</b>	0,646	1,958
<b>9</b>	1,368	2,000
<b>10</b>	0,814	1,966
<b>11</b>	1,372	2,000
<b>12</b>	1,068	2,000
<b>13</b>	0,866	1,968
<b>14</b>	1,012	1,922

**Tabelle 21: Konzentrationen in µg/µl und Ratios (A260/A280) der 14 Negativproben**

### **3.2.2 Werte der Genexpression aus der RT-PCR**

Die aus den Patientenproben gewonnenen cDNA wurde zusammen mit der aus den 14 Negativproben gemischten Master-cDNA mittels RT-PCR hinsichtlich der Expression der in den Vorversuchen als geeignet identifizierten Marker untersucht. Als geeignete Marker wurden Gene definiert, deren RQ-Wert bei Erhöhung der Tumorzellkonzentration einen Anstieg zeigte, während der Ct-Wert abnahm. Im Rahmen der Spiking-Versuche erwiesen sich die Marker CK19, Snail, FoxC2 und Twist als geeignet und wurden somit auf die Patientenproben übertragen. Als Referenzgen wurde wie schon in den Vorversuchen die rRNA 18s verwendet. Die AvgCt-Werte (engl. Average-Ct = „Durchschnitts-Ct“) der Patientenproben für 18s sind in Abbildung 26 dargestellt und in Tabelle 22.

Die Werte von 18s zeigten eine sehr starke Schwankungsbreite mit dem 10. Perzentil bei 13.718 und dem 90. Perzentil bei 24.041. Mit dem niedrigsten AvgCt-Wert bei 12.712 und dem höchsten AvgCt-Wert bei 28.737 lag der Median bei 16.947 (vgl. Abb.26). Bei den Proben 16 und 69 war keinerlei Expression von 18s zu detektieren.



**Abbildung 26: Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Housekeeping-Gens 18s bei 2 nicht detektierten und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der AvgCt-Werte zwischen 10 und 30 auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.

<b>Expression Referenzgen 18s</b>	
<b>Patienten-Nr.</b>	<b>AvgCt</b>
1	13.507
2	14.506
3	22.215
4	14.317
5	15.129
6	22.453
7	17.742
8	15.462
9	20.562
10	14.842
11	13.655
12	16.156
13	23.870
14	24.158
15	23.318
16	Undet.
17	18.027
18	15.048
19	12.712
20	27.527
21	26.833

22	19.162
23	19.722
24	14.077
25	19.408
26	13.533
27	13.557
28	24.692
29	24.012
30	19.640
31	14.989
32	14.202
33	20.024
34	18.293
35	17.300
36	21.343
37	15.209
38	15.156
39	14.899
40	22.058
41	24.675
42	20.245
43	14.855
44	15.868
45	13.567
46	16.637
47	20.403
48	15.287
49	19.462
50	25.142
51	15.886
52	17.326
53	17.100
54	22.171
55	27.888
56	13.301
57	15.675
58	15.475
59	24.939
60	15.738
61	23.139
62	19.509
63	14.681
64	20.520
65	25.129



66	13.917
67	23.047
68	15.740
69	Undet.
70	15.063
71	16.750
72	15.990
73	14.756
74	22.890
75	22.615
76	13.999
77	12.997
78	14.026
79	13.734
80	14.707
81	13.085
82	18.493
83	16.947
84	15.120
85	15.189
86	20.066
87	27.961
88	18.456
89	14.876
90	21.310
91	28.737
92	13.092
93	18.218
94	16.240
95	21.277
96	23.237
97	17.151
98	13.499
99	21.899
100	14.681
101	23.956
102	22.859
103	13.832
104	14.591
105	15.638
106	14.996
107	14.857
108	15.067
109	20.424

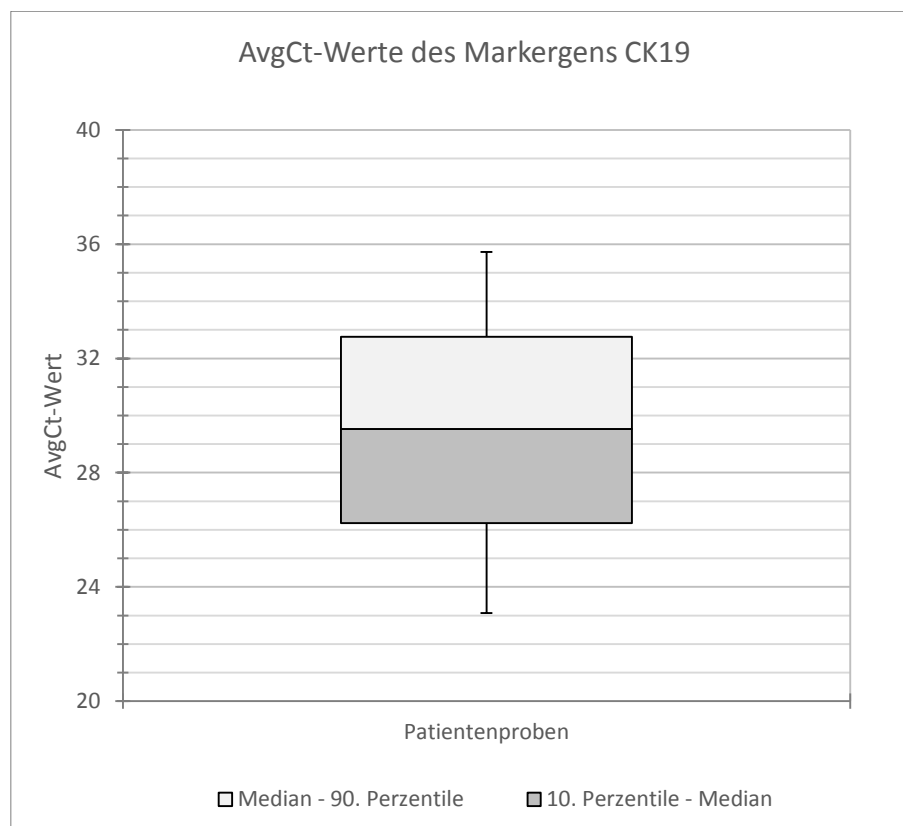
<b>110</b>	17.688
<b>111</b>	20.469

**Tabelle 22: AvgCt-Werte der RT-PCR für 18s in den Patientenproben:** 2 undetektierbare Proben und 109 Proben zwischen 12.712 und 28.737, die breiten Striche stellen die Unterteilung gemäß der verschiedenen Tumoreigenschaften (G1-, G2-, G3-Grading und M1-Status) dar.

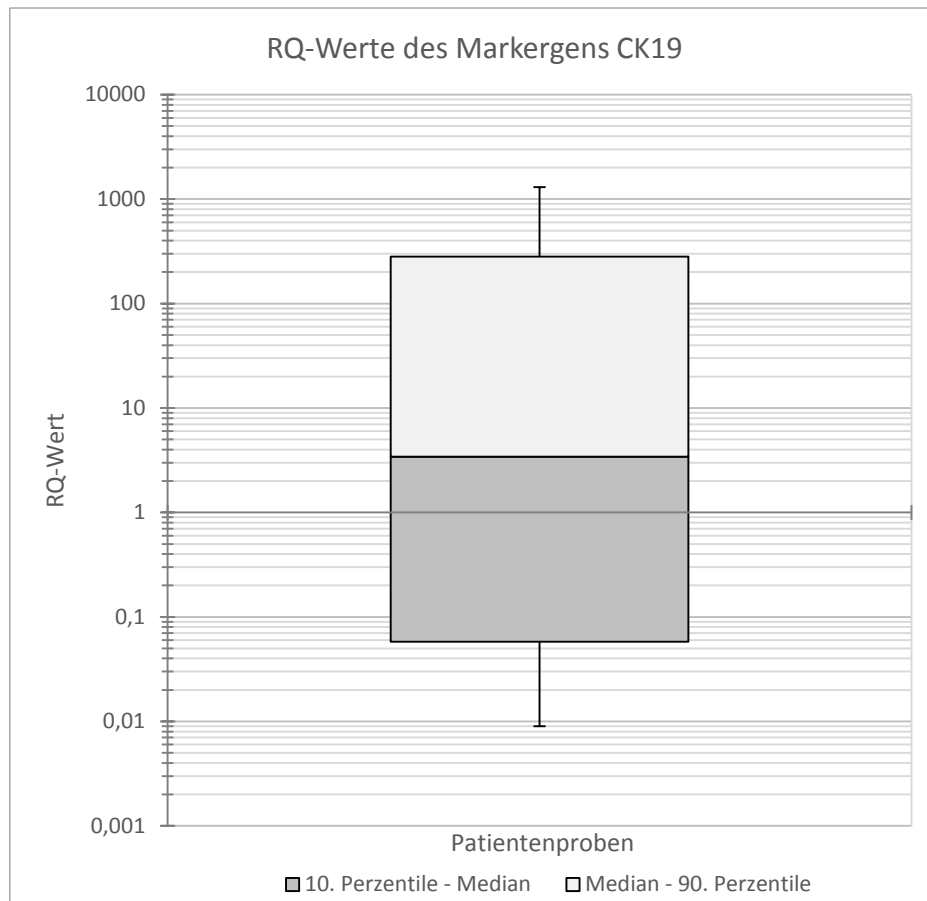
In den folgenden Tabellen (Tab. 23 bis Tab. 26) und Abbildungen (Abb. 27 bis Abb. 34) werden die Ergebnisse der RT-PCR für die Marker CK19, Snail, FoxC2 und Twist mittels AvgCt- und RQ-Wert für die untersuchten Patientenproben angegeben und graphisch dargestellt. Die Proben sind hierbei in absteigender Reihenfolge des RQ-Wertes des jeweiligen Markergens sortiert. Auch hier bedeutet „undet.“ eine nicht erfolgte Detektion des Markers.

### 3.2.2.1 Genexpression von CK19

Obwohl CK19 in den Vorversuchen einen sehr steilen Anstieg zeigte, wiesen bei den Patientenproben nur knapp 60% eine verstärkte Expression mit einem RQ-Wert größer als 1 auf. Der Schwankungsbereich der gemessenen RQ-Werte bewegte sich dabei zwischen 0.009 als Minimal und 1300 als Maximalwert mit seinem Median bei 3.410. 80 Prozent der RQ-Werte befanden sich hierbei im Bereich zwischen 0.058 und 281.550 (vgl. Abb. 28). Der niedrigste AvgCt-Wert lag bei 23.082 und der höchste bei 35.729 mit einem medianen Wert von 29.533. 80 Prozent der AvgCt-Werte bewegten sich im Bereich zwischen 26.232 und 32.758 (vgl. Abb. 27). Auch hier waren zwei Proben nicht detektierbar aufgrund fehlender 18s-Werte. Tabelle 23 gibt die gemessenen AvgCt- und RQ-Werte für CK19 an.



**Abbildung 27: Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Markergens CK19 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der AvgCt-Werte zwischen 20 und 40 auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.



**Abbildung 28: Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens CK19 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der RQ-Werte auf der y-Achse (zur besseren Darstellung in logarithmischer Skalierung auf der Basis 10). Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.

Expression Marker CK19		
Patienten-Nr.	AvgCt	RQ
74	25.181	1300.000
3	27.383	618.298
54	26.773	464.449
40	26.689	455.367
87	32.800	360.582
61	29.619	328.461
50	29.016	321.357
6	28.593	315.297
109	24.752	312.067
14	30.214	305.227
75	27.024	299.694
64	24.939	277.014
96	27.323	275.168
28	28.941	239.363
42	25.939	217.951
20	32.908	183.548
15	30.178	174.828

59	30.364	138.013
25	26.661	126.098
13	31.435	107.276
41	31.382	104.963
23	27.242	104.832
35	24.098	101.373
36	29.126	87.287
34	24.003	86.926
99	28.955	80.637
93	24.128	77.685
101	31.118	74.902
55	35.128	74.619
7	26.157	65.134
9	29.057	56.307
29	30.357	55.967
67	32.183	52.098
71	25.968	49.215
91	35.318	48.817
21	34.278	43.874
82	26.517	42.599
90	28.177	40.007
105	23.082	35.972
102	31.148	34.298
95	29.784	30.486
51	23.177	30.095
62	27.360	25.690
47	29.257	23.702
49	28.318	10.171
22	27.996	9.970
83	27.073	9.233
88	28.768	8.121
30	30.963	7.506
46	27.477	5.981
86	30.884	5.718
33	32.070	4.549
65	35.729	3.822
60	26.399	3.661
110	28.532	3.410
8	28.189	3.282
70	28.687	2.320
111	32.216	1.824
53	29.792	1.706
98	26.251	1.555
73	26.997	1.315
43	27.168	1.251
48	27.278	1.157

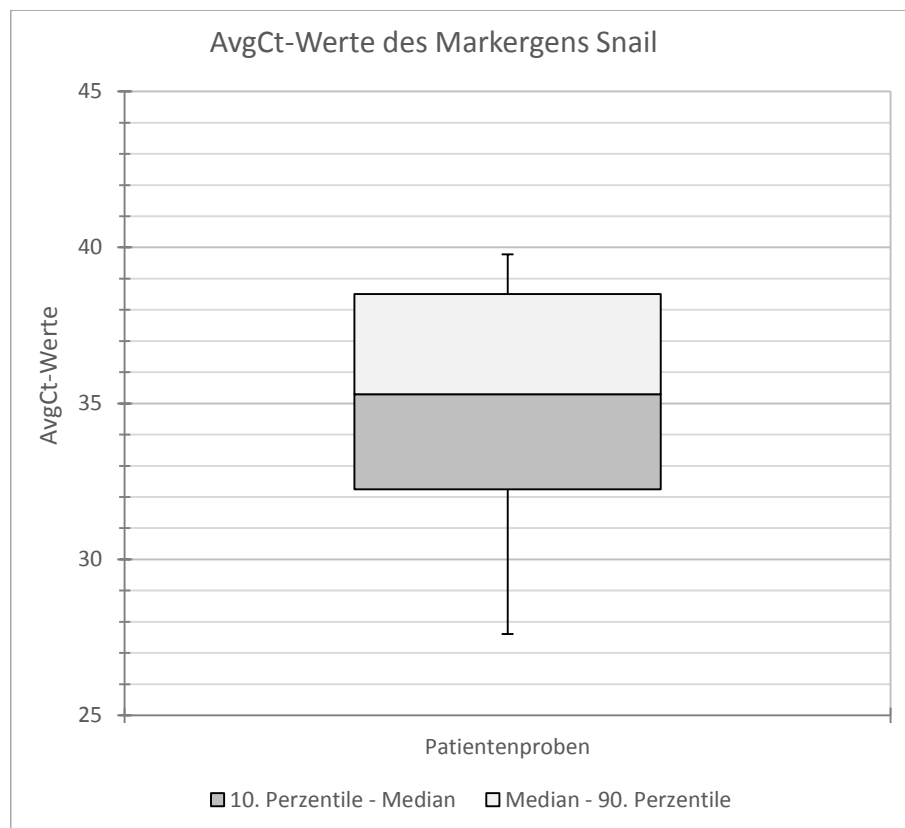
39	28.309	1.037
5	29.533	1.026
58	27.751	0.950
17	31.007	0.947
37	28.782	0.900
84	28.681	0.854
68	30.878	0.813
108	28.000	0.806
94	28.741	0.806
106	28.054	0.735
18	28.563	0.653
89	29.016	0.572
103	28.249	0.491
76	27.815	0.441
63	28.532	0.401
2	30.281	0.396
10	30.736	0.334
44	31.331	0.243
72	30.838	0.216
12	31.271	0.215
78	29.960	0.177
38	31.154	0.168
57	30.493	0.163
56	30.781	0.160
26	30.519	0.148
19	28.539	0.132
31	32.157	0.131
4	31.979	0.107
52	32.768	0.106
80	31.514	0.097
97	32.749	0.094
104	31.397	0.094
85	32.299	0.073
24	30.106	0.068
11	31.948	0.063
107	32.180	0.038
81	31.247	0.038
77	31.362	0.033
27	30.942	0.027
79	32.756	0.021
66	32.288	0.017
100	34.080	0.016
45	33.167	0.014
1	32.918	0.011
32	32.980	0.010
92	32.104	0.009

16	Undet.	Undet.
69	Undet.	Undet.

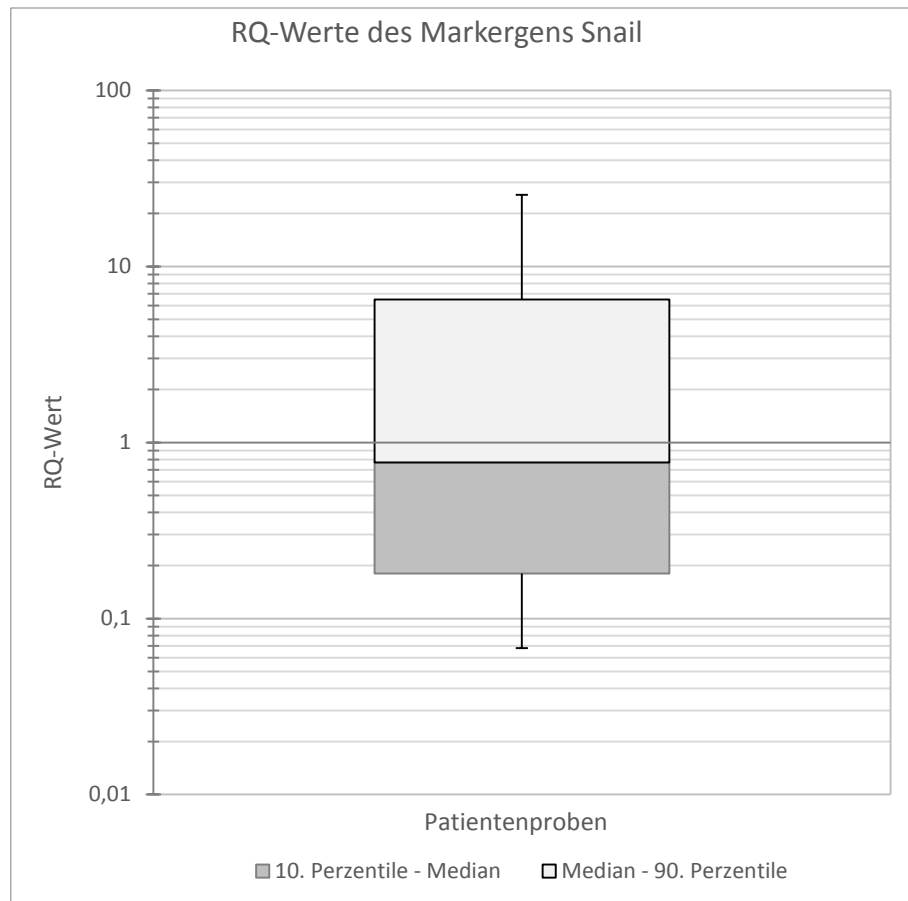
**Tabelle 23: AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für CK19 in den Patientenproben:** 2 undetektierbare Proben und 109 Proben mit AvgCt-Werten zwischen 23.082 und 35.729, sowie RQ-Werten zwischen 0.009 und 1300.000.

### 3.2.2.2 Genexpression von Snail

Die Detektion von Snail erfolgte bei AvgCt-Werten zwischen 27.604 als Minimal- und 39.774 als Maximalwert und einem Median bei 35.290 erst in späten PCR-Zyklen. 80 Prozent der detektierbaren Werte lagen hierbei zwischen 32.252 und 38.503 (vgl. Abb. 29). 41 Proben wurden aufgrund des Endes der RT-PCR nach 40 Zyklen nicht detektiert. Etwas mehr als die Hälfte der 70 detektierten Proben zeigten eine Herabregulierung von Snail mit RQ-Werten kleiner als 1. Die messbaren RQ-Werte bewegten sich bei Snail zwischen 0.068 als niedrigstem und 25.531 als höchstem Wert. Der Median RQ-Wert lag bei 0.769, wobei sich 80 Prozent der gemessenen RQ-Werte zwischen 0.180 und 6.476 bewegten (vgl. Abb. 30). Tabelle 24 stellt die gemessenen AvgCt- und RQ-Werte in absteigender Reihenfolge vom höchsten RQ-Wert ausgehend dar, wobei auch hier die nicht detektierbaren Proben wieder am Ende angeordnet sind.



**Abbildung 29: Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte für das Markergen Snail bei 41 nicht detektierten und 70 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der AvgCt-Werte zwischen 25 und 45 auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.



**Abbildung 30: Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens Snail bei 41 nicht detektierten und 70 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der RQ-Werte auf der y-Achse (zur besseren Darstellung in logarithmischer Skalierung auf der Basis 10). Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.

Expression Marker Snail		
Patienten-Nr.	AvgCt	RQ
7	32.254	25.531
75	38.021	18.311
63	29.728	15.387
81	27.604	10.747
5	31.330	7.917
83	32.752	6.662
42	37.651	6.504
3	38.706	6.473
64	37.293	4.651
103	32.230	4.566
95	37.536	3.217
27	32.748	3.143
51	32.900	3.100
30	38.472	2.577
104	33.892	2.442
98	32.886	2.301
86	37.422	2.273

32	33.972	2.103
108	33.104	2.072
106	33.100	1.965
88	36.111	1.848
24	34.210	1.635
33	39.538	1.606
100	34.623	1.565
22	39.551	1.370
107	33.581	1.279
38	33.919	1.135
71	35.988	1.088
43	34.445	1.007
57	34.317	1.003
105	34.758	0.971
37	34.309	0.898
109	39.774	0.829
56	33.006	0.787
93	39.201	0.776
17	37.870	0.762
82	36.954	0.699
18	35.226	0.604
77	31.685	0.597
8	35.429	0.582
62	39.286	0.580
39	36.000	0.502
45	33.530	0.494
73	35.499	0.453
78	33.179	0.433
44	36.111	0.407
4	34.849	0.393
46	36.933	0.392
92	35.142	0.370
2	35.163	0.361
79	33.175	0.354
26	32.131	0.331
66	34.521	0.327
80	34.271	0.326
84	35.354	0.309
60	36.455	0.302
48	35.754	0.283
19	34.058	0.269
76	35.623	0.246
89	35.493	0.237
85	35.943	0.216
70	36.736	0.201
1	35.409	0.183



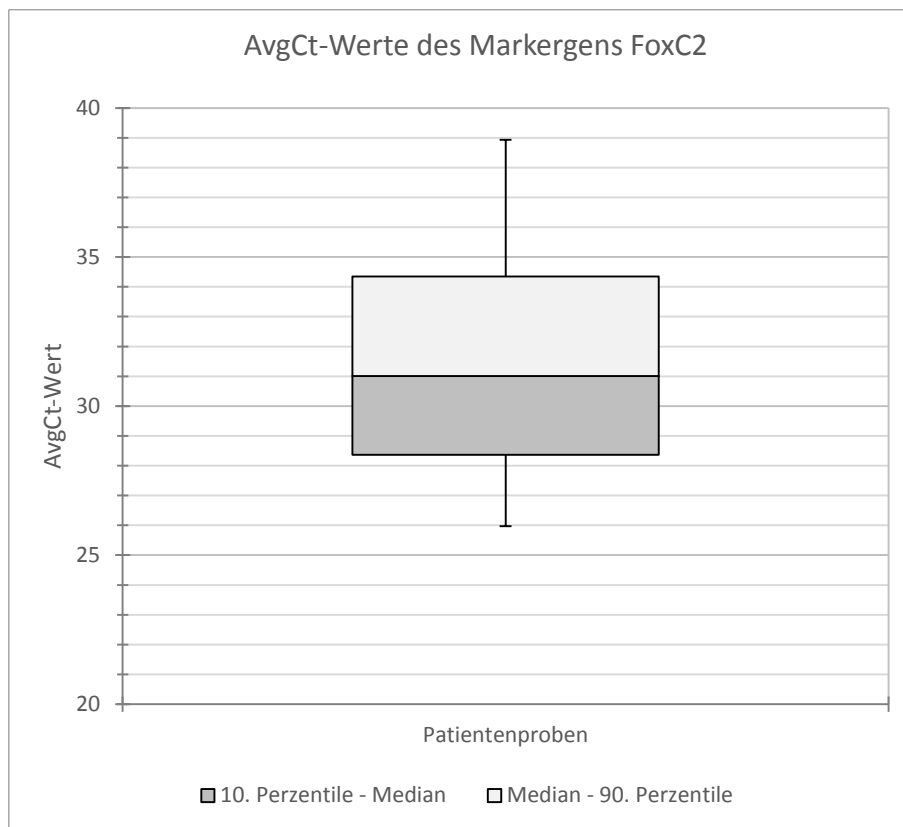
10	35.814	0.152
68	37.838	0.150
72	38.480	0.135
58	37.408	0.102
31	38.863	0.078
11	35.695	0.073
25	30.106	0.068
6	Undet.	Undet.
9	Undet.	Undet.
12	Undet.	Undet.
13	Undet.	Undet.
14	Undet.	Undet.
15	Undet.	Undet.
16	Undet.	Undet.
20	Undet.	Undet.
21	Undet.	Undet.
23	Undet.	Undet.
28	Undet.	Undet.
29	Undet.	Undet.
34	Undet.	Undet.
35	Undet.	Undet.
36	Undet.	Undet.
40	Undet.	Undet.
41	Undet.	Undet.
47	Undet.	Undet.
49	Undet.	Undet.
50	Undet.	Undet.
52	Undet.	Undet.
53	Undet.	Undet.
54	Undet.	Undet.
55	Undet.	Undet.
59	Undet.	Undet.
61	Undet.	Undet.
65	Undet.	Undet.
67	Undet.	Undet.
69	Undet.	Undet.
74	Undet.	Undet.
87	Undet.	Undet.
90	Undet.	Undet.
91	Undet.	Undet.
94	Undet.	Undet.
96	Undet.	Undet.
97	Undet.	Undet.
99	Undet.	Undet.
101	Undet.	Undet.
102	Undet.	Undet.

<b>110</b>	Undet.	Undet.
<b>111</b>	Undet.	Undet.

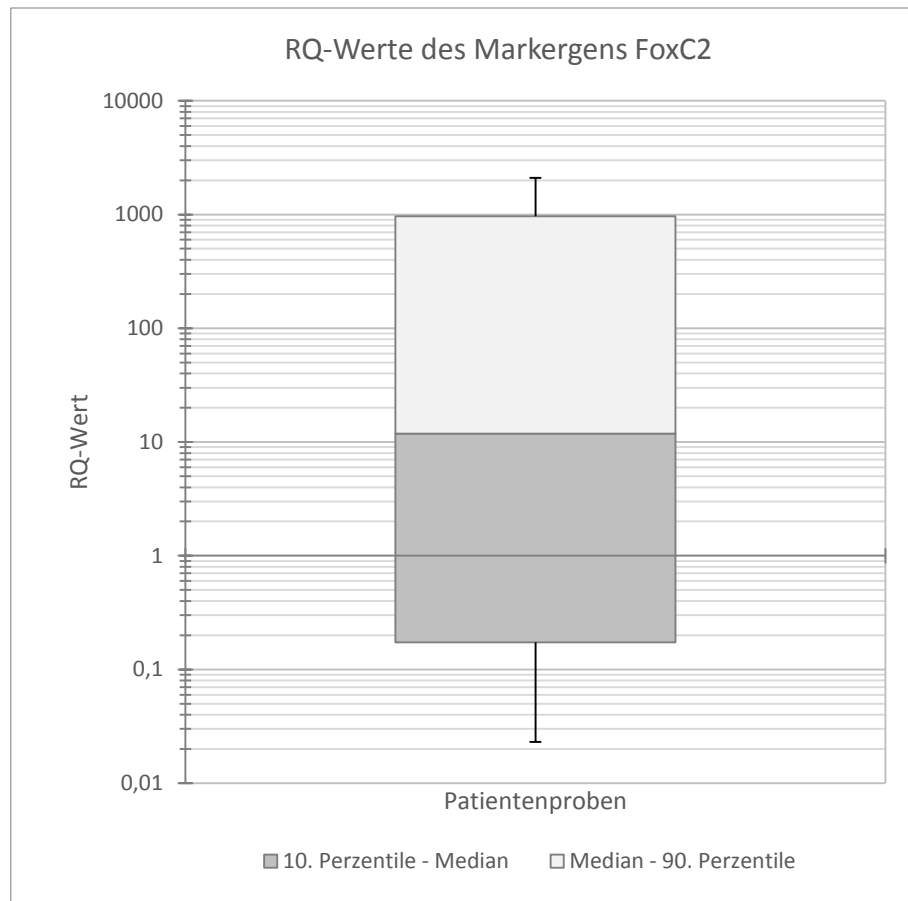
**Tabelle 24: AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für Snail in den Patientenproben:** 41 undetektierbare Proben und 70 gemessene Proben mit AvgCt-Werten zwischen 27.604 und 39.774, sowie RQ-Werten zwischen 0.068 und 25.531.

### 3.2.2.3 Genexpression von FoxC2

Auch FoxC2 wurde mit einem Medianen Wert von 31.004 eher in späteren PCR-Zyklen detektiert. Der niedrigste Wert für AvgCt lag dabei bei 25.975 und der höchste bei 38.927, wobei sich der Großteil der Proben zwischen dem 10. Perzentil bei 28.370 und dem 90. Perzentil bei 34.346 befand (vgl. Abb 31). Zwei Proben waren aufgrund fehlender 18s-Werte nicht detektierbar. Bei RQ-Werten von minimal 0.023 und maximal 2100 und einem Median von 11.851 zeigte nur Twist eine höhere Genexpression. Mit 80 Prozent der gemessenen Proben bei RQ-Werten zwischen 0.173 und 965.648, zeigte FoxC2 eine weite Streuung der Werte mit etwas mehr als zwei Drittel der Proben mit einem RQ-Wert größer als 1, wie in Abbildung 32 dargestellt. Tabelle 25 gibt die für FoxC2 bestimmten AvgCt- und RQ-Werte an.



**Abbildung 31: Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Markergens FoxC2 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der AvgCt-Werte zwischen 20 und 40 auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.



**Abbildung 32: Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens FoxC2 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der RQ-Werte auf der y-Achse (zur besseren Darstellung in logarithmischer Skalierung auf der Basis 10). Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.

Expression Marker FoxC2		
Patienten-Nr.	AvgCt	RQ
40	29.067	2100.000
14	30.001	1710.000
64	25.997	1640.000
87	34.303	1590.000
54	29.584	1580.000
28	30.940	1420.000
75	29.453	1210.000
3	28.602	1180.000
6	28.938	1100.000
91	34.054	976.513
74	30.033	976.150
96	28.575	963.023
50	30.386	884.201
109	27.461	840.632
41	31.816	838.702
61	31.030	755.117
13	31.285	575.001

42	29.186	549.898
20	34.537	548.023
59	32.285	448.538
25	27.860	408.059
21	34.292	401.167
15	31.267	397.139
7	25.975	327.247
101	31.618	322.542
23	28.720	279.478
36	30.405	267.184
34	27.112	238.193
99	30.105	221.099
90	28.872	205.982
9	29.738	169.628
29	33.407	159.698
67	33.373	139.642
35	28.261	135.523
102	31.800	132.828
55	38.927	128.327
93	26.850	98.148
71	27.644	94.177
82	28.152	86.048
62	29.257	84.906
95	31.089	77.338
30	30.502	76.752
47	31.586	50.917
33	31.618	46.216
65	35.889	42.093
88	30.067	41.123
22	30.516	41.084
86	32.133	29.991
51	26.043	29.343
83	29.097	28.292
49	30.208	19.520
105	28.182	18.480
46	29.538	15.466
70	28.935	11.947
110	30.874	11.851
60	28.397	11.276
53	31.845	9.844
68	29.897	9.803
8	29.371	6.408
111	34.750	5.548
94	29.226	4.798
18	29.025	4.378
43	29.887	4.117

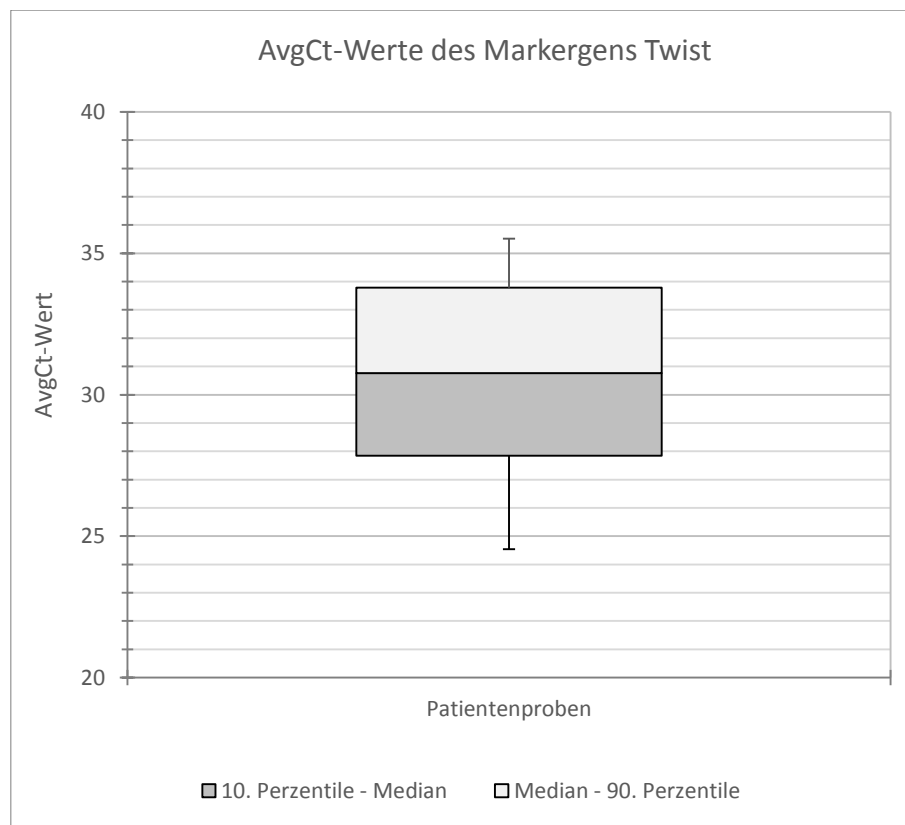
5	29.942	3.421
37	30.456	3.044
106	30.201	2.922
108	30.334	2.818
73	30.516	2.486
58	29.305	2.301
76	29.912	2.236
63	29.874	1.948
39	32.214	1.657
89	31.285	1.479
17	33.598	1.451
103	29.306	1.435
98	29.360	1.096
2	31.118	0.984
44	32.813	0.939
48	30.546	0.854
10	31.695	0.829
26	31.004	0.786
12	32.718	0.730
72	33.536	0.721
56	31.259	0.703
31	32.739	0.648
38	32.845	0.560
4	31.867	0.513
78	31.324	0.432
24	32.048	0.418
57	32.298	0.332
84	30.608	0.281
107	33.504	0.269
80	32.802	0.248
104	32.728	0.227
19	31.133	0.201
27	32.656	0.191
11	32.629	0.190
97	34.920	0.174
85	34.715	0.170
81	31.908	0.150
52	35.172	0.142
79	33.113	0.102
45	33.870	0.091
100	34.557	0.068
66	33.940	0.068
32	34.929	0.062
92	32.861	0.044
1	34.611	0.031
77	34.519	0.023

16	Undet.	Undet.
69	Undet.	Undet.

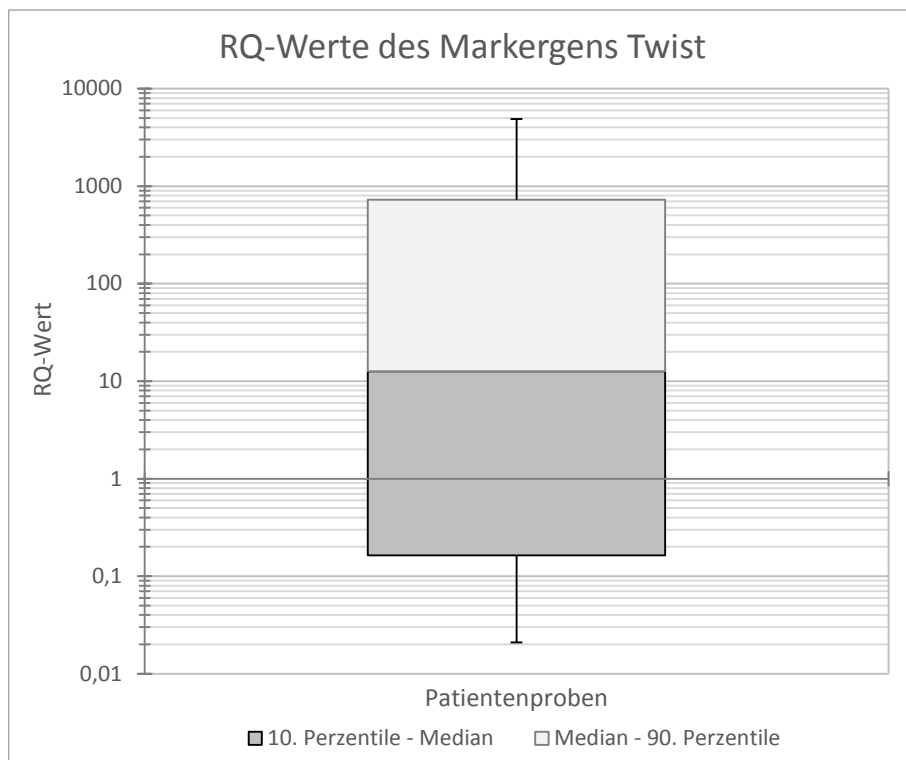
**Tabelle 25: AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für FoxC2 in den Patientenproben:** 2 undetektierbare Proben und 109 gemessene Proben mit AvgCt-Werten zwischen 25.975 und 38.927, sowie RQ-Werten zwischen 0.023 und 2100.000.

### 3.2.2.4 Genexpression von Twist

Die AvgCt-Werte von Twist bewegten sich im Bereich von minimal 24.539 und maximal 35.512. Der Median lag bei 30.762 und gehörte damit nach CK19 zu den eher früh detektierten Genen. 80 Prozent der gemessenen Proben bewegten sich zwischen 27.844 und 33.780 (vgl. Abb. 33). Zwei Proben blieben bei fehlenden Housekeeping-Gen-Werten undetektiert. Die RQ-Werte lagen in den detektierten Proben zwischen 0.021 als niedrigstem und 4870 als höchstem Wert mit dem Median der Werte bei 12.652 und somit der höchsten Genexpression. Die RQ-Werte zeigten mit dem 10. Perzentil bei 0.164 und dem 90. Perzentil bei 725.910 ebenfalls eine relativ weite Streuung (vgl. Abb. 34). Bei 73 Proben, also beinahe zwei Drittel, ließ sich ein RQ-Wert größer als 1 messen und somit eine verstärkte Genexpression nachweisen. Die gemessenen AvgCt- und RQ-Werte für Twist werden in Tabelle 26 dargestellt.



**Abbildung 33: Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Markergens Twist bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der AvgCt-Werte zwischen 20 und 40 auf der y-Achse. Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.



**Abbildung 34: Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens Twist bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit auf der x-Achse und der RQ-Werte auf der y-Achse (zur besseren Darstellung in logarithmischer Skalierung auf der Basis 10). Der dunkelgraue Kasten gibt den Bereich zwischen der 10. Perzentile und dem Median, der hellgraue Kasten den Bereich zwischen Median und 90. Perzentile an, die Darstellung der Minimal- und Maximalwerte erfolgt durch die Positiv- und Negativindikatoren.

Expression Marker Twist		
Patienten-Nr.	AvgCt	RQ
91	32.650	4870.000
40	26.949	3030.000
59	27.862	2880.000
28	29.718	2600.000
87	32.900	2300.000
3	27.258	1640.000
64	24.538	1350.000
54	28.488	1130.000
6	28.080	1090.000
75	27.965	995.248
55	34.447	953.039
96	30.014	669.128
74	28.873	641.577
14	30.721	629.817
42	27.441	613.095
50	30.762	561.069
61	31.005	495.008
29	31.473	481.121
101	31.170	437.813
109	27.941	414.582
15	30.499	410.571

41	31.561	360.214
34	26.229	346.268
21	33.594	294.112
67	31.666	293.780
36	29.527	275.112
99	30.080	223.981
9	28.730	207.191
102	31.164	205.566
20	34.876	195.721
13	32.226	181.861
90	30.206	153.954
71	26.586	126.369
23	29.198	112.381
7	26.836	98.627
25	29.117	95.621
35	27.712	65.982
95	30.471	63.896
93	28.511	58.463
47	30.011	54.585
49	28.457	54.121
62	28.188	53.336
82	28.297	41.871
22	30.810	26.423
88	29.927	24.874
83	28.603	21.876
33	32.032	19.433
51	26.417	18.658
105	27.772	16.887
65	35.512	16.372
60	26.219	15.283
86	32.285	14.808
30	32.103	14.171
70	28.201	12.807
46	28.354	12.652
53	30.089	11.065
94	29.417	7.919
110	31.121	6.865
8	29.233	3.856
68	30.617	3.836
111	34.779	3.738
43	28.269	3.720
37	28.965	3.080
58	28.619	3.050
106	30.055	2.224
63	27.992	2.150
18	28.973	2.051



17	32.199	1.729
73	29.312	1.685
103	29.098	1.650
39	31.056	1.231
5	30.556	1.223
89	30.859	1.090
108	31.350	0.958
98	29.569	0.945
44	31.408	0.895
12	31.367	0.841
84	31.661	0.741
38	31.015	0.717
24	31.078	0.647
76	30.097	0.579
56	30.936	0.567
10	31.526	0.566
48	31.017	0.508
97	34.296	0.506
2	31.412	0.439
57	31.817	0.382
26	31.280	0.364
72	32.808	0.351
31	32.860	0.334
78	30.854	0.322
104	32.433	0.277
4	31.930	0.269
107	33.344	0.207
52	34.528	0.183
81	30.745	0.181
11	32.065	0.171
85	33.903	0.164
19	30.295	0.163
27	32.669	0.150
79	31.846	0.132
100	34.164	0.089
66	31.869	0.086
80	33.515	0.082
32	34.734	0.056
45	33.152	0.054
92	34.077	0.035
1	33.825	0.024
77	33.769	0.021
16	Undet.	Undet.
69	Undet.	Undet.

**Tabelle 26: AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für Twist in den Patientenproben:** 2 undetektierbare Proben und 109 gemessene Proben mit AvgCt-Werten zwischen 24.538 und 35.512, sowie RQ-Werten zwischen 0.021 und 4870.000.

## 4 Diskussion

Bei vielen Mammakarzinom-Patientinnen sind CTCs oder DTCs nachweisbar [146]. Ein Nachweis sowohl von DTCs als auch von CTCs geht häufig mit einem verschlechterten Gesamtüberleben und einer höheren Rate an Krankheitsrückfällen einher [38; 36]. Da der Nachweis von DTCs durch hierzu notwendige Knochenmarksbiopsie mit sehr großen Strapazen für die Patienten verbunden ist, könnte sich der weniger invasive Nachweis von CTCs als Verfahren in der Diagnostik, Nachsorge und Prognosestellung etablieren. Die bisher verfügbaren Nachweismethoden (Cell Search® System, AdnaTest®) nutzen epitheliale Marker wie EpCAM zur Detektion der CTCs [43; 34]. Diese epithelialen Marker können jedoch im Rahmen der EMT und der daraus folgenden Phänotyp-Veränderung fehlen wodurch in diesen Fällen die Detektion von CTCs mit diesen Nachweissysteme erschwert ist [45; 53]. Ein Nachweis von EMT-typischen Markergenen, wie den in dieser Arbeit getesteten Genen Snail, FoxC2 und Twist, in Kombination mit üblicherweise detektierten CTC-Markern wie CK19 mittels RT-PCR könnte einen zuverlässigen Detektionsansatz für CTCs unabhängig von deren Phänotyp darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenen EMT-typische Markergene sowie das etablierte CTC-Gen CK19 verwendet, um anhand gesammelter Patientenproben die Aussagekraft dieser Gene in Bezug auf die Aggressivität und die Morbidität des Tumors zu testen.

### 4.1 Vorversuche: Spiking-Experimente

Um die begrenzt verfügbaren Patientenproben erst bei weiterführenden Experimenten verwenden zu müssen, wurde zunächst ein Modellsystem zur Erprobung der Gene und ihrer Detektionsmethode erstellt. Hierzu wurde das Blut gesunder Spenderinnen zwischen 18 und 50 Jahren mit je 10, 100 und 1000 Brustkrebszellen pro Milliliter, bestehend aus einer Mischung der Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB231, versehen (Spiking) und anschließend mittels PCR auf die Expression der zuvor ausgewählten CTC- und EMT-Markergene CK19, Snail, Slug, FoxC2, Twist, Akt2 und ALDH1 untersucht. Die Weiterverarbeitung des EDTA-Blutes zur Anreicherung und Abnahme der mononukleären Zellfraktion und Isolation der RNA erfolgte stets direkt nach der Abnahme des Blutes. Für die Umschreibung in cDNA wurden nach Möglichkeit nur RNA-Proben mit einer Ratio zwischen 1,7 und 2,0 verwendet, um die nötige Reinheit zu gewähren. Alle untersuchten Gene waren in vorangegangenen Studien mit einem schlechteren Outcome assoziiert worden [79; 81; 92-93; 96; 107; 109; 118; 123; 134; 135].

Das Spiking wurde aufgrund der benötigten Zeit zur Probensammlung bei gesunden Spenderinnen in zwei Versuchen durchgeführt. Hierbei wurden in Versuch 1 und Versuch 2 verschiedene Blutproben gesunder Spenderinnen verwendet, wodurch geringfügige Abweichungen der Ct- und RQ-Werte erklärbar sind. Mit Ausnahme von Twist zeigten die Markergene und die interne Kontrolle GAPDH in Versuch 2 stets einen flacheren Kurvenverlauf. Dies kann durch eine geringfügige Veränderung der insgesamt vorhandenen Zellzahl oder Verdünnung erklärbar sein. Die Marker FoxC2 und Twist zeigten im Gegensatz zu allen anderen getesteten Markergenen jedoch nur eine geringe Variabilität zwischen den beiden Versuchen mit nahezu identischem Verlauf der RQ-Kurven in beiden Versuchen. Dieser ähnliche Verlauf könnte aufgrund einer sehr engen Assoziation der beiden Marker mit der Tumorzellzahl aber durch die von Twist bewirkte Aktivierung von FoxC2 entstehen.

Der Marker GAPDH diene während der Vorversuche als interne Funktionskontrolle für die Funktionalität der RT-PCR. Wie erwartet zeigte sich ein Anstieg der RQ-Werte und damit eine verstärkte Genexpression mit Erhöhung der Tumorzellzahl. Da somit die Funktionalität der

Nachweismethode erwiesen war, wurde in den Patientenproben auf GAPDH als weiteren Marker verzichtet.

CK19 hatte sich bereits in früheren Studien als Marker zur CTC-Detektion bewährt [79; 82] und lieferte auch hier gut messbare Werte zur Erstellung einer Kurve der relativen Quantifizierung (RQ). Die Kurve stieg bei einer Zugabe von 100 Tumorzellen/ml etwas steiler an als bei einer Tumorzellkonzentration von 1000 Tumorzellen/ml. Diese Verringerung des Anstiegs könnte durch eine Zunahme der Phänotypveränderungen im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition und die daraus resultierende geringere Ausprägung des epithelialen Markers erklärbar sein. Alles in allem zeigte CK19 einen Anstieg der RQ-Werte mit zunehmender Zellzahl, was auf eine enge Assoziation dieses Gens zur Tumorzellzahl hinweist.

Für Snail ergaben sich ebenfalls ansteigende Kurven der RQ-Werte bei abnehmenden Ct-Werten. Diese stieg bei Spiking mit 10 Tumorzellen/ml in Versuch 1 nur sehr flach an, zeigte jedoch bei Erhöhung der Tumorzellzahl einen wesentlich steileren Anstieg. Dies könnte damit im Zusammenhang stehen, dass Snail bei höherer Tumorzellzahl aufgrund verstärkter Expression im Rahmen der EMT besser nachweisbar ist. In Versuch 2 zeigte sich bei anderen Blutproben ein deutlich gleichmäßigerer Anstieg der RQ-Werte bei zunehmender Tumorzellzahl und somit eine direkte Assoziation zwischen verstärkter Genexpression und Anzahl der Tumorzellen.

Slug konnte durch die RT-PCR in der Nullprobe nicht detektiert werden. Möglicherweise erfolgte der Nachweis der Expression von Slug erst in nicht mehr detektierten Zyklen oder die TaqMan®-Probe war mit einer Amplikonlänge von 79 Basenpaaren nicht passend für den Versuch gewählt. Eine Ersatz-TaqMan®-Probe stand nicht zur Verfügung. Bei Zugabe von Tumorzellen erfolgte der Nachweis erst in sehr späten Zyklen und es konnten aufgrund der fehlenden Nullprobe keine RQ-Werte für die einzelnen Proben errechnet werden. Während bei Versuch 1 die Ct-Werte stets um der 33. bzw. 34. Zyklus lagen und stets auf und ab schwankten, zeigten die Ct-Werte bei Versuch 2 eine Abnahme bei steigender Tumorzellzahl, so dass durchaus von einer Assoziation zwischen Tumorzellzahl und Genexpression auszugehen ist. Aufgrund der fehlenden RQ-Werte und der nicht messbaren Nullprobe wurde Slug jedoch nicht für die Patientenproben genutzt.

Bei dem gut detektierbaren Marker FoxC2 wurde wiederum ein Anstieg der RQ-Werte gemessen. Diese verlief sehr flach bei niedrigen Tumorzellzahlen, zeigte jedoch in beiden Versuchen den stärksten Anstieg bei einer Tumorzellkonzentration von 1000 Tumorzellen/ml. Dies könnte darauf hinweisen, dass FoxC2 bei höherer Tumorzellzahl besser detektierbar wird aufgrund einer erhöhten Anzahl von Zellen, die die EMT durchlaufen. FoxC2 kann durch Twist aktiviert werden, was die starke Ähnlichkeit der aus den RQ-Werten erstellten Kurven von FoxC2 und Twist erklären könnte.

Twist zeigte von den Markergenen der EMT den steilsten Anstieg der RQ-Werte. Wie auch bei FoxC2 verlief die Kurve bei niedrigen Tumorzellzahlen eher flach, stieg jedoch bei Zugabe von 1000 Tumorzellen pro Milliliter sehr steil an. Auch hier könnte der einfachere Nachweis des Gens bei höherer Tumorzellzahl und der häufigere Ablauf einer EMT eine Erklärung für den starken Anstieg liefern.

Die RQ-Werte von Akt2 bildeten zwar eine ansteigende Kurve, der Anstieg war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als bei CK19, Snail, FoxC2 und Twist. Bei Versuch 2 blieben die RQ-Werte stets kleiner 1, sodass sich eine erhöhte Genexpression darstellen ließ. In Versuch 1 waren die RQ-Werte bei einer Tumorzellkonzentration von 100 bzw. 1000 Tumorzellen/ml zwar größer als 1 und zeigten auch eine ansteigende Tendenz, jedoch war die Genexpression bei einer Tumorzellkonzentration 10/ml mit

einem RQ-Wert von 0.716 herabreguliert. Aufgrund des allenfalls schwachen Anstieges der RQ-Kurve in Versuch 1 und der deutlichen Herabregulation der Genexpression in Versuch 2 wurde beschlossen, Akt2 nicht in den Patientenproben zu verwenden.

ALDH1 zeigte eine sehr wechselhafte Genexpression, sodass einer Erstellung einer ansteigenden Kurve der RQ-Werte nicht möglich war. Bei Versuch 1 zeigte sich sowohl bei einer Tumorzellkonzentration von 100/ml eine Steigerung als auch bei einer Tumorzellzahl von 10 bzw. 1000 Tumorzellen/ml eine Verminderung der Genexpression. Bei Versuch 2 waren alle RQ-Werte kleiner 1 mit abnehmender Tendenz und deuteten somit auf eine progrediente Herabregulation des Gens bei Erhöhung der Tumorzellzahl hin. In beiden Versuchen zeigte sich jedoch eine deutliche Herabregulation bei der Zugabe von 1000 Tumorzellen pro Milliliter somit waren Tumorzellzahl und Genexpression nicht oder allenfalls negativ assoziiert. Aufgrund der wechselhaften RQ-Werte wurde ALDH1 nicht auf die Patientenproben übertragen.

Für die Übertragung und Messung an den Patientenproben wurden schließlich die Markergene CK19, Snail, FoxC2 und Twist ausgewählt.

## 4.2 Untersuchung der Patientenproben

Im nächsten Schritt wurden die vier an Hand der Vorversuche ausgewählten Marker auf die Patientenproben übertragen. Es wurden insgesamt 111 Blutproben von Patientinnen mit Mammakarzinom in unterschiedlichsten Stadien (vgl. Kapitel 2.3) untersucht.

Hierbei fiel eine sehr variable Detektion des Housekeeping-Genes 18s auf. Die AvgCt- Werte schwankten zwischen einem Minimalwert von 12.712 und einem Maximalwert von 28.737. Zwei Proben (Proben-Nr. 16 und 69) waren gar nicht zu detektieren. Ein Fehler im Rahmen der RT-PCR-Messung oder einer Verunreinigung der Primerproben ließ sich durch wiederholte Testung der stark erhöhten Proben mit nahezu identischem Ergebnis, sowie durch Detektion der überhöhten Werte an unterschiedlichen Stellen der PCR-Platte ausschließen. Folge der erhöhten 18s-Werte war bei vielen Proben, dass eine Detektion von Markergenen mit Expression in späten Zyklen, wie beispielsweise Snail, oft nicht möglich war. Aufgrund der Annahme, dass sich die Tumorzellkonzentration in den Patientenproben im Bereich der mit 0 bis 1000 Tumorzellen/ml gespiketen Proben der Vorversuche bewegen müsste, wurde aus den 18s-Werten der Vorversuche ein Mittelwert von 15.065 errechnet. Anhand dieses berechneten Wertes wurde der Grenzwert für 18s schließlich auf 15.100 festgelegt und alle Proben mit höherem 18s-Wert aus der Auswertung ausgeschlossen. Mit Festlegung dieses Grenzwertes blieben 35 verwertbare Patientenproben unterschiedlichsten Tumorstadiums übrig.

Die Betrachtung der RT-PCR-Ergebnisse der 35 verwertbaren Patientendaten ermöglichte eine Unterteilung der Patienten in 2 Untergruppen. In Gruppe 1, die aus 16 Patientenproben bestand (vgl. Tab. 27), waren alle Markergene mit einem RQ-Wert kleiner 1 herabreguliert.

Pat.-Nr.	T	N	M	G	Immunhistochemie	18s AvgCt	CK19 RQ	Snail RQ	FoxC2 RQ	Twist RQ
1	cT1b	Nx	Mx	G1	ER/PR +, Her2 -	13.507	0.011	0.183	0.031	0.024
2	pT1b	pN0	Mx	G1	ER/PR +, Her2 -	14.506	0.396	0.361	0.984	0.439
4	pT1b	pN0	Mx	G1	ER/PR +, Her2 -	14.317	0.107	0.393	0.513	0.269
10	pT1c	pN0	pM0	G1	ER/PR +, Her2 -	14.842	0.334	0.152	0.829	0.566
11	pT1c	pN0	Mx	G1	ER/PR +, Her2 -	13.655	0.063	0.073	0.190	0.171
19	pT2	pN1a	pM0	G1	ER/PR +, Her2 -	12.712	0.132	0.269	0.201	0.163
26	pT1c	pN1	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	13.533	0.148	0.331	0.786	0.364
31	pT1c	pN0	pM0	G2	ER/PR +, Her2 -	14.989	0.131	0.078	0.648	0.334
45	pT2	pN0	Mx	G2	ER/PR +, Her2 fehlt	13.567	0.014	0.494	0.091	0.054
56	pT2	pN1a	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	13.301	0.160	0.787	0.703	0.567
66	pT3	pN0	pM0	G2	ER/PR +, Her2 -	13.917	0.017	0.327	0.068	0.086
77	pT1b	pN0	Mx	G3	ER +, PR -, Her2 -	12.997	0.033	0.597	0.023	0.021
78	pT1b	pN0	Mx	G3	ER/PR +, Her2 -	14.026	0.177	0.433	0.432	0.322
79	pT1b	pN0	Mx	G3	Triple negativ	13.734	0.021	0.354	0.102	0.132
80	pT1c	pN0	Mx	G3	ER/PR +, Her2 +	14.707	0.097	0.326	0.248	0.082
92	pT2	pN1	pM0	G3	ER/PR +, Her2 -	13.092	0.009	0.370	0.044	0.035

Tabelle 27: Patientendaten und Werte der relativen Quantifizierung aus Gruppe 1

In der aus 19 Patientenproben bestehenden Gruppe 2 hingegen zeigte jeweils mindestens eines der Markergene einen RQ-Wert größer 1 (vgl. Tab. 28).

Pat.-Nr.	T	N	M	G	Immunhistochemie	18s AvgCt	CK19 RQ	Snail RQ	FoxC2 RQ	Twist RQ
18	pT2	pN0	Mx	G1	ER +, PR -, Her2 -	15.048	0.653	0.604	4.378	2.051
24	pT1b	pN1a	pM0	G2	ER/PR +, Her2 -	14.077	0.068	1.635	0.418	0.647
27	pT1c	pN1	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	13.557	0.027	3.143	0.191	0.150
32	pT1c	pN1a	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	14.202	0.010	2.103	0.062	0.056
39	pT1c	pN1a	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	14.899	1.037	0.502	1.657	1.231
43	pT2	pN1a	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	14.855	1.251	1.007	4.117	3.720
63	pT2	pN0	fehlt	G2	ER/PR +, Her2 -	14.681	0.401	15.387	1.948	2.150
70	pT3	pN1a	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	15.063	2.320	0.201	11.974	12.807
73	pT3	pN1a	pM0	G2	ER/PR +, Her2 -	14.756	1.315	0.453	2.486	1.685
76	pT3	pN1a	Mx	G2	ER/PR +, Her2 -	13.999	0.441	0.246	2.236	0.579
81	pT1c	pN1a	Mx	G3	ER/PR +, Her2 +	13.085	0.038	10.747	0.150	0.181
89	pT2	pN0	pM0	G3	Triple negativ	14.876	0.572	0.237	1.479	1.090
98	pT4b	pN2a	pM1	G3	Triple negativ	13.499	1.555	2.301	1.096	0.945
100	pT1c	pN0	pM1	G3	ER/PR fehlt, Her2 -	14.681	0.016	1.565	0.068	0.089
103	pT1c	pN0	pM1	G3	ER/PR fehlt, Her2 -	13.832	0.491	4.566	1.435	1.650
104	pT1b	pN1	pM1	fehlt	ER/PR +, Her2 -	14.591	0.094	2.442	0.227	0.277
106	pT3	pN1a	pM1	G3	ER/PR +, Her2 -	14.996	0.735	1.965	2.922	2.224
107	pT2	pN3c	pM1	G2	ER/PR +, Her2 -	14.857	0.038	1.279	0.269	0.207
108	pyT3	pN1a	pM1	G2	ER +, PR -, Her2 -	15.067	0.806	2.072	2.818	0.958

**Tabelle 28: Patientendaten und Werte der relativen Quantifizierung aus Gruppe 2**

Bei einem Vergleich der beiden Gruppen fiel auf, dass die Tumore in Gruppe 1 einen weniger aggressiven Tumortyp zu zeigen schienen als in Gruppe 2 (vgl. Abb. 35).

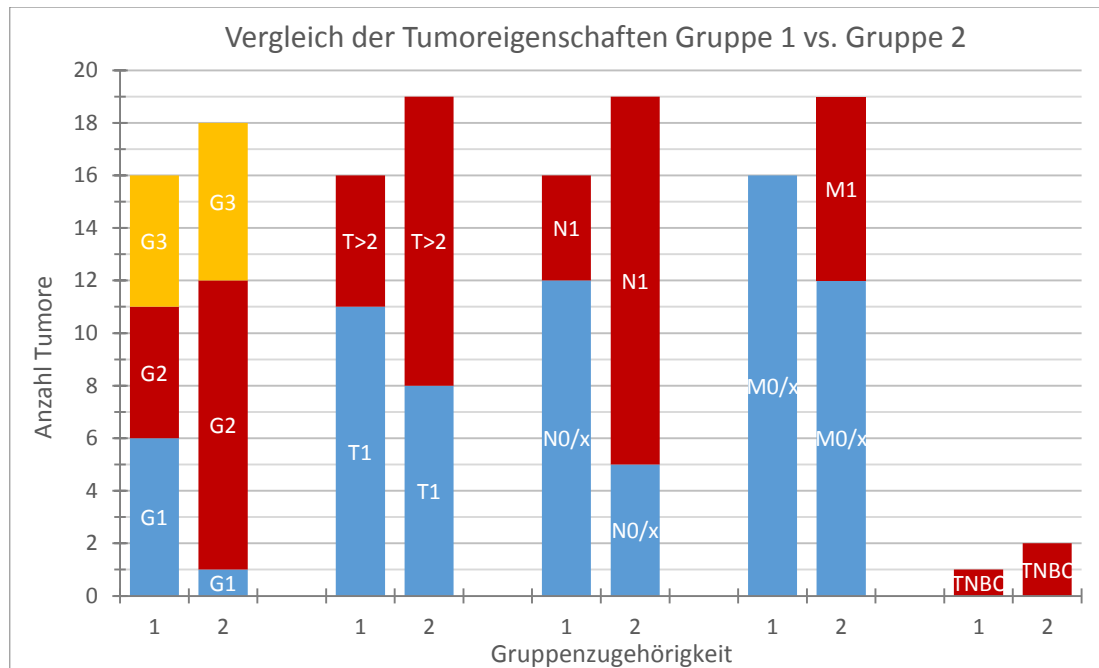
In Gruppe 1 befand sich mit lediglich vier Proben im T2- (Pat.-Nr. 19, 45, 56 und 92) und einer Probe im T3-Stadium (Pat.-Nr. 66) der Großteil der 16 Tumore in niedrigen T-Stadien. Dagegen besaßen in Gruppe 2 mehr als die Hälfte der Karzinome (11 von 19 Tumoren) ein Stadium T2 oder höher. Im Gegensatz zu Gruppe 1 war hier sogar ein Tumor mit dem Stadium T4b (Pat.-Nr. 98) vertreten.

Während in Gruppe 1 gerade einmal vier Tumore Lymphknotenmetastasen zeigten (Pat.-Nr. 19, 26, 56 und 92), waren in Gruppe 2 bis auf fünf Tumore (Pat.-Nr. 18, 63, 89, 100 und 103) alle Patientinnen nodalpositiv. Bei diesen fünf Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen in Gruppe 2 handelte es sich um einen intermediären Tumor, um einen Tumor mit fehlendem und zwei Tumore mit positivem Fernmetastasen-Status, sowie einen aggressiven Triple-negativen Tumor (Pat.-Nr. 89). Es zeigte sich also, dass selbst die nodalnegativen Tumore in Gruppe 2 eher aggressiveren Phänotyps waren. Zusätzlich zu der höheren Rate an nodalpositiven Karzinomen waren in der zweiten Gruppe zudem bei sieben von 19 Tumoren Fernmetastasen nachzuweisen.

Auch beim Grading zeigte Gruppe 2 eine aggressivere Tumorbilogie. Während in Gruppe 1 sechs der 16 Tumore ein G1-Grading aufwiesen, besaßen bis auf einen mittelgroßen Tumor (Pat.-Nr. 18) alle Tumore in Gruppe 2 ein Grading von G2 oder höher.

Zusätzlich befanden sich in der ersten Gruppe lediglich ein eher kleiner und nodalnegativer Tumor der einen Triple-Negativen Subtyp (TNBC) aufwies, wohingegen die beiden in Gruppe 2 aufgetretenen Triple-negativen Tumore größer und im Falle von Pat.-Nr. 98 auch noch nodalpositiv waren. Zudem befanden sich in Gruppe 2 zwei Tumore (Pat.-Nr. 100 und 103) mit Fernmetastasen, für die der

Hormonrezeptorstatus fehlt. Es ließ sich also nicht mit Sicherheit ausschließen, dass diese beiden Tumore nicht auch in die Subkategorie der Triple-negativen Tumore fallen könnten.



**Abbildung 35: Vergleich der Tumoreigenschaften von Gruppe 1 und Gruppe 2:** Antragung der Gruppenzugehörigkeit, wobei 1 Gruppe 1 und 2 Gruppe 2 entspricht, auf der x-Achse und der Anzahl der Tumore zwischen 0 und 20 auf der y-Achse. Aufteilung gemäß der Malignität der Tumoreigenschaften, wobei die hellblauen Balken jeweils die geringere Malignität anzeigen (und im Falle des Gratings gelb die höchste Malignität anzeigt).

Obwohl CK19 bei den Vorversuchen den steilsten Anstieg in der Kurve und die höchsten Maximalwerte der relativen Quantifizierung erreichte, zeigten nur fünf der ausgewählten 35 Patientenproben einen RQ-Wert größer 1 und somit eine verstärkte Genexpression. Auffallend war, dass es sich bei diesen fünf Tumoren um aggressivere Tumore mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen handelte. Diese Ergebnisse decken sich auch mit vorangegangenen Studien in denen CK19 stets mit metastasierten Tumoren [86] und verkürztem krankheitsfreien Überleben [79] einherging. Vor dem Hintergrund der mesenchymal-epithelialen Transition (MET), also dem Gegenstück der EMT nach erfolgter Metastasierung, sind diese Ergebnisse gut erklärbar.

Die restlichen 30 Patientenproben zeigten eine zum Teil sehr deutliche Herabregulierung des Gens mit RQ-Werten von bis zu 0.009. Hier fiel vor allem die Herabregulation bei den fernmetastasierten Tumoren (Pat.-Nr. 100, 103, 104, 106, 107 und 108) und zwei Triple-negativen Tumoren (Pat.-Nr. 79 und 89) auf. Eventuell ist diese verminderte Genexpression des epithelialen Markers vor dem Hintergrund der EMT durch verstärkte Ausprägung mesenchymaler Marker bei gleichzeitiger Herabregulation epithelialer Marker zu erklären.

Snail hingegen war in 13 der 35 Patientenproben hochreguliert. Mit einer verstärkten Genexpression in 13 der 19 Patientenproben der zweiten Gruppe war es somit der EMT-Marker, der am häufigsten RQ-Werte größer 1 aufwies. Auffallend hierbei war, dass alle Tumore mit einer erhöhten Genexpression von Snail positiv im Bezug auf entweder Lymphknoten- oder Fernmetastasen waren. Snail scheint also im Rahmen einer metastatischen Tumorstreuung von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies lässt sich mit seinen aus früheren Studien bekannten Fähigkeiten zur Triggerung früher EMT-Abläufe und der damit einhergehenden Mobilitätssteigerung der Zellen, sowie seine Möglichkeiten zur Hemmung der Apoptose erklären[93; 92; 90].

Von den 22 Patientenproben mit einem RQ-Wert kleiner 1 für Snail waren bis auf sieben Tumore alle nodal-negativ. Erstaunlicherweise zeigen zwei der drei Triple-negativen Tumoren (Pat.-Nr. 79 und 89) wie schon bei CK19 auch bei Snail eine deutliche Herabregulierung des Gens mit RQ-Werten von 0.354 bzw. 0.237. Beide Tumoren besaßen jedoch keine Lymphknotenmetastasen, was die verringerte Genexpression möglicherweise erklären kann.

Bei FoxC2 zeigten zwölf Patientenproben der 2. Gruppe einen RQ-Wert größer 1. Acht der Proben waren nodalpositiv und alle zwölf Tumore mit erhöhter Genexpression waren mindestens mittelgroß ( $T \geq 1c$ ). Folglich scheint FoxC2 vor allem mit der Tumorgroße zu korrelieren, was sich durch seinen Einfluss auf die Angiogenese erklären lässt [106]. Erwartungsgemäß zeigten die beiden größeren Triple-negativen Tumoren einen RQ-Wert größer 1, was sich gut mit vorangegangenen Studien deckt, die einer erhöhte Genexpression von FoxC2 in TNBCs beschrieben haben [108].

Unter den 23 Proben mit einem RQ-Wert kleiner 1 für FoxC2 befanden sich neun Proben mit positivem Lymphknoten- und drei Proben mit positivem Fernmetastasen-Status (Pat.-Nr. 100, 104 und 107). Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass FoxC2 vornehmlich für die Regulation mesenchymaler Gene zuständig und auf die Aktivierung durch andere Transkriptionsfaktoren wie Snail oder Twist angewiesen ist.

Neun Proben aus Gruppe 2 zeigten mit RQ-Werten größer 1 für Twist eine verstärkte Expression dieses Markergens. Mit fünf der neun Proben war mehr als die Hälfte der Tumore mit erhöhter Genexpression nodalpositiv. Allerdings zeigten nur zwei der sieben fernmetastasierten Tumore und nur einer der drei Triple-negativen Tumoren eine verstärkte Twist-Expression. Im Gegensatz zu anderen Studien [113] konnte im Rahmen dieser Arbeit keine direkte Assoziation zwischen einer verstärkten Expression von Twist und einer Metastasierung bestätigt werden. Twist scheint also entweder keine Rolle bei der Ausbildung von Fernmetastasen zu spielen oder diese nur indirekt über die Aktivierung von FoxC2 zu bewirken, um dann im Fernmetastasenstatus herunterreguliert zu verbleiben. Letzteres würde erklären, weshalb alle neun Proben mit RQ-Werten größer 1 für Twist zudem eine verstärkte Genexpression von FoxC2 besaßen.

Elf der 16 Tumore mit einem Stadium T2 oder höher zeigten eine verstärkte Genexpression von mindestens einem der Markergene. Acht dieser 11 Tumore waren zusätzlich noch nodalpositiv. Von den sieben Tumoren mit einem Stadium niedriger als T2, die eine erhöhte Genexpression von mindestens einem der Markergene zeigten, hatten fünf einen Durchmesser größer 1 cm. Im Rahmen der Metastasierungsmodelle scheint eine erhöhte Genexpression der EMT-Marker also am ehesten mit einer großen Tumorgroße einherzugehen, was mit dem Modell der linearen Progression korrelieren würde. Eine wie bei der parallelen Progression zu erwartende Streuung in frühen Tumorstadien zeigte sich bei lediglich zwei Tumoren (Pat.-Nr. 24 und 104). Diese zeigten eine erhöhte Genexpression von Snail im Stadium T1b und waren beide nodalpositiv.



### 4.3 Ausblick

Bei der Untersuchung einzelner Tumormarker zeigen sich häufig Schwankungen in der Genexpression, was es notwendig macht verschiedene Markergene zu testen. Um durch die EMT veränderte Tumorzellen detektieren zu können, müssen also zuerst verlässliche Markergene für die EMT und anschließend zuverlässige Gene zur Detektion der zirkulierenden Tumorzellen an sich bestimmt werden. Im Rahmen einer Vorversuchsreihe mit Spiking können somit verschiedene Gene getestet werden, ohne wertvolle Ressourcen zu verschwenden. Nur die Marker mit der besten Funktion werden anschließend auf die nur in beschränkter Menge vorhandenen Patientenproben übertragen. Zudem ermöglicht das Modellsystem eine Überprüfung der Zuverlässigkeit der Detektionsmethode an sich, indem man zusätzlich Gene wie GAPDH testet, deren Ausprägung im Rahmen des Spikings bereits bekannt ist. Die Verwendung eines solchen Modellsystems sollte auch in zukünftigen Versuchsreihen standardmäßig durchgeführt werden. Zudem könnten in Zukunft noch weitere mögliche EMT-Marker getestet werden. Zu testende Gene könnten beispielsweise Vimentin oder ZEB1 sein. Bei Vimentin handelt es sich um ein Intermediärfilament, das normalerweise in mesenchymalen Zellen exprimiert wird. Sein Auftreten in epithelialen Tumoren geht mit einer höheren Invasivität und schlechteren Prognose einher [147], da es jedoch auch von Leukozyten exprimiert wird, wäre die Unterscheidung zwischen Leukozyten und CTCs möglicherweise erschwert. Bei Brustkrebs ist es mit niedrigen Leveln des Östrogenrezeptors und einem hohen Grading assoziiert [148]. Das Zinc finger E-box binding protein 1 (ZEB1) kann E-Cadherin herunterregulieren und somit die EMT induzieren. ZEB1 geht mit einer schlechteren Prognose, höheren Metastasierungsrate und einer erhöhten Therapieresistenz der Tumore einher [149]. Zudem kann ZEB1 den Phänotypenübergang von Mammakarzinomzellen in Tumorstammzellen ermöglichen [150].

Die Detektion von CTCs ist derzeit beim Mammakarzinom noch nicht Teil der Routinediagnostik, sondern wird im Rahmen klinischer Studien evaluiert [151]. Obwohl es sich bei der CTC-Diagnostik um eine weniger invasive Methode handelt, als die Knochenmarkpunktion zur DTC-Diagnostik, ist ihr klinischer Nutzen weniger klar. Im Rahmen verschiedener Studien erwiesen sich CTCs bei metastasierten Patientinnen als geeigneter Faktor zur Prognosestellung und zum Therapiemonitoring [35; 152]. In einer Stellungnahme aus dem Jahr 2013 empfiehlt die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) den Einsatz des Cell Search® Systems zur klinischen Entscheidungsfindung in Einzelfällen, vor allem bei metastasierten Tumoren [153]. Dieses System ist jedoch hauptsächlich zur Detektion EpCAM-positiver CTCs geeignet [154]. Tumorzellen, die eine EMT durchlaufen haben und diesen Oberflächenmarker nicht mehr exprimieren, werden von dem System nicht detektiert und lenken eine Therapieentscheidung möglicherweise in die falsche Richtung. Um auch EpCAM-negative Zellen zu erfassen, wäre eine Kombination des Cell Search® Systems mit einem Filtrationssystem oder einer qRT-PCR denkbar. So würden alle CTCs unabhängig von ihrer Expression epithelialer Marker erfasst. Um eine zuverlässige CTC-Detektion unabhängig vom Phänotyp der Zelle zu gewährleisten, ist folglich nicht nur eine Evaluation verschiedener Detektionssysteme und deren eventuelle Kombination, sondern auch eine Evaluation verschiedener Markergene nötig.

Durch eine genaue Erfassung und Charakterisierung der CTCs könnte die Behandlung des Mammakarzinoms deutlich optimiert werden. Im Rahmen des Stagings könnte schon bei Erstdiagnose durch eine wenig invasive Blutabnahme eine mögliche Metastasierung untersucht und eine Therapieentscheidung bezüglich zytostatischer Therapie und Operabilität getroffen werden. Zudem könnte die Charakterisierung der CTCs eine vom Primärtumor unabhängige, auf die metastasierten Tumorzellen zugeschnittene Therapie und somit eine Prognoseverbesserung ermöglichen. Des

Weiteren könnten im Rahmen der Tumornachsorge mit Hilfe der CTC-Detektion Therapiestrategien evaluiert und angepasst werden. Hierdurch könnte die Prognose der betroffenen Patientinnen wesentlich positiv beeinflusst werden.

## 5 Zusammenfassung

Mit einer weltweiten Neuerkrankungsrate von 1,7 Millionen und 500.000 assoziierten Todesfällen pro Jahr ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung der Frau und die fünfthäufigste Krebstodesursache weltweit. Die Prognose der Patientinnen wird erheblich durch eine metastatische Streuung der Tumorzellen beeinflusst. Im Rahmen der Metastasierung wird zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) bei der Streuung über Blut- und Lymphbahnen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Um eine Lösung vom Primärtumor und einen Transport über das Blut- und Lymphsystem zu ermöglichen, verändern einige der Tumorzellen im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) ihren Phänotyp. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich ausgewählte EMT-Markergene im Rahmen einer Blutuntersuchung mittels RT-PCR zur CTC-Detektion eignen und eine Aussage über die Aggressivität einer Brustkrebserkrankung erlauben.

Hierfür wurden im Rahmen einer Vorversuchsreihe Spiking-Experimente durchgeführt und anschließend die geeignet erscheinenden Markergene für die Untersuchung von Blutproben von Mammakarzinompatientinnen verwendet.

Im Rahmen der sogenannten Spiking-Experimente wurde das Blut gesunder Probandinnen mit jeweils 0, 10, 100 und 1000 Mammakarzinomzellen pro Milliliter versehen. Als zugesetzte Tumorzellen wurde eine Mischung der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 verwendet. Nach Extraktion der Leukozyten und Zugabe der Tumorzellen erfolgte die Extraktion der RNA, die Umschreibung in cDNA und anschließende eine Real-Time-PCR zur Untersuchung der Proben auf die Gene CK19, GAPDH, Snail, Slug, FoxC2, Twist, Akt2 und ALDH1 mit 18s als Housekeeping-Gen. Die Auswertung erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode und ermöglichte mithilfe der gemessenen RQ-Werte, die ein Maß für die Genexpression darstellen, die Erstellung von Graphen für die einzelnen Gene.

Anschließend wurden die in den Vorversuchen als geeignet identifizierten EMT-Markergene Snail, FoxC2 und Twist, sowie CK19 als etabliertes Gen zur Identifizierung von CTCs auf Patientenproben übertragen. Dabei wurde das EDTA-Vollblut von 111 Patientinnen mit Mammakarzinom und eine Mischung aus 14 gesunden Kontrollen untersucht. Die Extraktion der RNA, die Umschreibung in cDNA und die anschließende RT-PCR mit Auswertung wurde nach demselben Protokoll wie bei den Vorversuchen durchgeführt, auf eine Zugabe von Tumorzellen wurde jedoch verzichtet.

In den Vorversuchen waren bei Slug die Werte der Nullprobe nicht detektierbar und somit eine Berechnung der RQ-Werte nicht möglich. Sowohl Akt2 als auch ALDH1 zeigten in den Vorversuchen sehr wechselhafte Genexpressionswerte mit RQ-Werten teils kleiner als 1. Daher wurden diese drei Gene nicht auf die Patientenproben übertragen. Für die Gene CK19, Snail, FoxC2 und Twist konnte mithilfe der RT-PCR eine ansteigende Genexpression bei ansteigender Tumorzellzahl beobachtet werden, sodass diese Gene für die Patientenproben weiter verwendet wurden.

Das Housekeeping-Gen 18s, das sich in den Vorversuchen als sehr reliabel erwies, zeigte im Rahmen der Untersuchung der Patientenproben eine sehr starke Schwankungsbreite. Nach Ausschluss verschiedener Fehlerquellen und erneuter Testung des Housekeeping-Genes, erfolgte schließlich ein Ausschluss aller Proben mit Ct-Werten  $> 15.100$  aus der Auswertung. Bei den verbliebenen 35 Patientenproben korrelierte der Nachweis einer erhöhten Genexpression bei mindestens einem dieser Markergene mit einer höheren Aggressivität des Mammakarzinoms. CK19 zeigte entgegen seines Verhaltens in den Vorversuchen, in denen ein starker Anstieg bei hoher Tumorzellzahl zu erkennen war, nur in wenigen Fällen eine verstärkte Genexpression. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Marker im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition vermindert ausgeprägt wird. Hingegen zeigten vor allem die EMT-Markergene Snail und FoxC2 eine verstärkte

Genexpression bei aggressiveren Tumoren. Dies legt den Schluss nahe, dass die EMT über diese beiden Gene zu einer aggressiveren Tumorbilogie bei Mammakarzinomen beiträgt. Twist zeigte nur bei Proben mit verstärkter FoxC2-Expression eine Hochregulation, was auf eine gegenseitige Abhängigkeit dieser Gene voneinander hindeuten kann.

Auffallend häufig erfolgte der Nachweis der überprüften Markergene erst in späten Tumorstadien mit mittelgroßem bis großem Tumordurchmesser. Dies deutete auf eine Tumorentwicklung im Sinne einer linearen Progression hin, also eine Metastasierung in späten Tumorstadien.

Da die RT-PCR einen Nachweis der Markergene im peripheren Blut ermöglicht, stellt sie eine wenig invasive Methode zur CTC-Diagnostik dar. Sie könnte eine wichtige Rolle in der Stadieneinteilung, der Prognoseeinschätzung und schlussendlich auch der Therapieentscheidung spielen und sollte an einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden. Eine Kombination der erfolgreich getesteten Markergene Snail und FoxC2 mit einer Betrachtung weiterer Markergene, wie beispielsweise ZEB1, erscheint zudem sinnvoll. Auch könnte Slug beispielsweise noch einmal mit einem anderen Primer überprüft werden, um seine Tauglichkeit zu testen. Zudem sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Hochregulation nur eines Markergens im Vergleich zu zwei oder mehr hochregulierten Markergenen auf die Entwicklung des Tumors hat. Eine Kombination mit etablierten Methoden zur CTC-Detektion, wie dem Cell Search® System oder der APAAP-Färbung könnte zudem die Detektion und Charakterisierung der Tumorzellen erleichtern.

Alles in allem könnte die genauere Identifizierung und Charakterisierung von CTCs und der Nachweis einer bereits durchlaufenen EMT eine detailliertere Stadieneinteilung und Nachsorge, sowie eine individualisiertere Therapie mit geringeren Nebenwirkungen und höherer Effizienz bei Mammakarzinompatientinnen ermöglichen.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- 1 WHO - International Agency for Research on Cancer: *GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Breast cancer*. auf: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>, abgerufen am: 09.11.2016.
- 2 Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (RKI): *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*, 2016.
- 3 Statistisches Bundesamt: *Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis)*. auf: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle n/HaeufigsteTodesursachen.html>, abgerufen am: 09.11.2016.
- 4 Statistisches Bundesamt: *Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen - Statistisches Bundesamt (Destatis)*. auf: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle n/Krebserkrankungen.html>, abgerufen am: 09.11.2016.
- 5 McPherson, K., et al.: *ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics*. BMJ, 2000. 321 (7261): p. 624–628.
- 6 Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland: *Krebs in Deutschland 2011/2012*; Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2015.
- 7 Robert Koch-Institut (RKI): *Brustkrebs*; Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2005.
- 8 Chlebowski, R.T., et al.: *Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women*. N Engl J Med, 2009. 360 (6): p. 573–587.
- 9 Reynolds, P., et al.: *Active Smoking, Household Passive Smoking, and Breast Cancer*. Journal of the National Cancer Institute (JNCI), 2004. 96 (1): p. 29–37.
- 10 Farvid, M.S., et al.: *Dietary protein sources in early adulthood and breast cancer incidence: prospective cohort study*. BMJ, 2014. 348: g3437.
- 11 AWMF, et al.: *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*, 2012.
- 12 Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO): *AGO-online - Mamma*. auf: <http://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/>, abgerufen am: 10.01.2017.
- 13 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer: *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. Lancet, 2002. 360 (9328): p. 187–195.
- 14 Kruk, J.: *Lifetime physical activity and the risk of breast cancer: a case-control study*. Cancer Detect Prev, 2007. 31 (1): p. 18–28.
- 15 Lynch, B.M., et al.: *Physical activity and breast cancer prevention*. Recent Results Cancer Res, 2011. 186: p. 13–42.
- 16 Deutsche Krebsgesellschaft: *Symptome bei Brustkrebs*. auf: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/symptome.html>, abgerufen am: 09.11.2016.
- 17 Gätje, R., et al.: *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2015.

- 18 Duffy, S.W., et al.: *Absolute numbers of lives saved and overdiagnosis in breast cancer screening, from a randomized trial and from the Breast Screening Programme in England*. J Med Screen, 2010. 17 (1): p. 25–30.
- 19 Tabar, L., et al.: *Swedish two-county trial: impact of mammographic screening on breast cancer mortality during 3 decades*. Radiology, 2011. 260 (3): p. 658–663.
- 20 Gotzsche, P.C., Jorgensen, K.J.: *Screening for breast cancer with mammography*. Cochrane Database Syst Rev, 2013 (6): CD001877.
- 21 Alvarez, S., et al.: *Role of sonography in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer: a systematic review*. AJR Am J Roentgenol, 2006. 186 (5): p. 1342–1348.
- 22 Deutsches Krebsforschungszentrum; Krebsinformationsdienst: *Mikroskopische Diagnostik in der Krebsmedizin: Der Blick auf Gewebe und Zellen*. auf: <https://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/krebs-befunde-verstehen.php>, abgerufen am: 10.01.2017.
- 23 Hartmann, A., et al.: *Aktueller Stand der Mammopathologie*. Ärztliche Praxis Gynäkologie, 2014 (3): p. 18–24.
- 24 Petru, E., et al.: *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*, 2014.
- 25 DocCheck Medical Services GmbH: *Ki-67 - DocCheck Flexikon*. auf: <http://flexikon.doccheck.com/de/Ki-67>, abgerufen am: 02.03.2017.
- 26 Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO): *AGO-Online - Mamma*. auf: <http://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/>, abgerufen am: 09.11.2016.
- 27 Deutsches Krebsforschungszentrum; Krebsinformationsdienst: *Brustkrebs und Metastasen*. auf: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/fortgeschritten.php>, abgerufen am: 03.03.2017.
- 28 Pantel, K., Brakenhoff, R.H.: *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. 4 (6): p. 448–456.
- 29 Lacroix, M.: *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. Endocr Relat Cancer, 2006. 13 (4): p. 1033–1067.
- 30 Klein, C.A.: *Parallel progression of primary tumours and metastases*. Nat Rev Cancer, 2009. 9 (4): p. 302–312.
- 31 Nicolazzo, C., Gradilone, A.: *Significance of Circulating Tumor Cells in Soft Tissue Sarcoma*. Anal Cell Pathol (Amst), 2015.
- 32 Ring, A., et al.: *Circulating tumour cells in breast cancer*. The Lancet Oncology, 2004. 5 (2): p. 79–88.
- 33 Ashworth, T.: *A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death*. Australian Medical Journal, 1896. 14 (3): p. 146–149.
- 34 Zhe, X., et al.: *Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack*. Am J Cancer Res, 2011. 1 (6): p. 740–751.
- 35 Franken, B., et al.: *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. Breast Cancer Res, 2012. 14 (5): R133.
- 36 Cristofanilli, M., et al.: *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. 23 (7): p. 1420–1430.
- 37 Braun, S., et al.: *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. 342 (8): p. 525–533.

- 38 Bidard, F.-C., et al.: *Disseminated Tumor Cells of Breast Cancer Patients: A Strong Prognostic Factor for Distant and Local Relapse*. Clin Cancer Res, 2008. 14 (11): p. 3306–3311.
- 39 Lucci, A., et al.: *Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study*. The Lancet Oncology, 2012. 13 (7): p. 688–695.
- 40 Zhang, L., et al.: *Meta-Analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2012. 18 (20): p. 5701–5710.
- 41 Braun, S., et al.: *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. N Engl J Med, 2005. 353 (8): p. 793–802.
- 42 Wiedswang, G., et al.: *Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2004. 10 (16): p. 5342–5348.
- 43 Ignatiadis, M., Reinholz, M.: *Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2011. 13 (5): p. 222.
- 44 Raff, T., et al.: *Klinische Bedeutung der minimalen Resterkrankung bei Leukämien*. Die Medizinische Welt, 2004. 55 (9): p. 269.
- 45 Paterlini-Brechot, P., Benali, N.L.: *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions*. Cancer Lett, 2007. 253 (2): p. 180–204.
- 46 Graves, H., Czerniecki, B.J.: *Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients: An Evolving Role in Patient Prognosis and Disease Progression*. Patholog Res Int, 2011.
- 47 Kurec, A.S., et al.: *Use of the APAAP method in the classification and diagnosis of hematologic disorders*. Clin Lab Med, 1988. 8 (1): p. 223–236.
- 48 Ntouroupi, T.G., et al.: *Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope*. Br J Cancer, 2008. 99 (5): p. 789–795.
- 49 Ghossein, R.A., et al.: *Molecular Detection of Micrometastases and Circulating Tumor Cells in Solid Tumors*. Clin Cancer Res, 1999. 5 (8): p. 1950–1960.
- 50 Kalluri, R., Weinberg, R.A.: *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. 119 (6): p. 1420–1428.
- 51 Yao, D., et al.: *Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation*. Mol Cancer Res, 2011. 9 (12): p. 1608–1620.
- 52 Micalizzi, D.S., et al.: *Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. 15 (2): p. 117–134.
- 53 Gorges, T.M., et al.: *Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition*. BMC Cancer, 2012. 12 (1): p. 178.
- 54 Raimondi, C., et al.: *Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 2011. 130 (2): p. 449–455.
- 55 Kölbl, A.C., et al.: *The Significance of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for Circulating Tumor Cells*. Int J Mol Sci, 2016. 17 (8): p. 1308.
- 56 Saiki, R.K., et al.: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. 239 (4839): p. 487–491.
- 57 Wikipedia: *Polymerase-Kettenreaktion*. auf: <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Polymerasekettenreaktion.svg>, abgerufen am: 10.07.2017.
- 58 Newton, C.R.; Graham, A.: *PCR; The Introduction to biotechniques series*, 1997.

- 59 Holzapfel, B., Wickert, L.: *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biol. Unserer Zeit, 2007. 37 (2): p. 120–126.
- 60 BIO-RAD: *Intro to PCR Primer & Probe Chemistries | Applications & Technologies | Bio-Rad*. auf: <http://www.bio-rad.com/en-kz/applications-technologies/introduction-pcr-primer-probe-chemistries>, abgerufen am: 13.03.2017.
- 61 Livak, K.J., et al.: *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR Methods Appl, 1995. 4 (6): p. 357–362.
- 62 Holland, P.M., et al.: *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88 (16): p. 7276–7280.
- 63 Livak, K.J., Schmittgen, T.D.: *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25 (4): p. 402–408.
- 64 Chervoneva, I., et al.: *Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR*. BMC Bioinformatics, 2010. 11: p. 253.
- 65 Huggett, J., et al.: *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. 6 (4): p. 279–284.
- 66 Tristan, C., et al.: *The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments*. Cell Signal, 2011. 23 (2): p. 317–323.
- 67 Meyer, A., et al.: *Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity*. BMC Evol Biol, 2010. 10: p. 70.
- 68 Goidin, D., et al.: *Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations*. Anal Biochem, 2001. 295 (1): p. 17–21.
- 69 Bas, A., et al.: *Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA,  $\beta$ -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes*. Scandinavian Journal of Immunology, 2004. 59 (6): p. 566–573.
- 70 Suzuki, T., et al.: *Control selection for RNA quantitation*. Biotechniques, 2000. 29 (2): p. 332–337.
- 71 Burchill, S.A., et al.: *Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Br J Cancer, 1995. 71 (2): p. 278–281.
- 72 Moll, R., et al.: *The human keratins: biology and pathology*. Histochem Cell Biol, 2008. 129 (6): p. 705–733.
- 73 Schweizer, J., et al.: *New consensus nomenclature for mammalian keratins*. J Cell Biol, 2006. 174 (2): p. 169–174.
- 74 National Center for Biotechnology Information (NCBI): *KRT19 keratin 19 [Homo sapiens (human)] - Gene*. auf: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3880>, abgerufen am: 27.03.2017.
- 75 Zaghloul, M.Z.: *Cytokeratin 19 (CK19) as a Tumor Marker in Pleural Effusion*. Tropical Medicine & Surgery, 2014.
- 76 Nechifor-Boila, A., et al.: *Diagnostic value of HBME-1, CD56, Galectin-3 and Cytokeratin-19 in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumors of uncertain malignant potential*. Rom J Morphol Embryol, 2014. 55 (1): p. 49–56.



- 77 Jain, R., et al.: *The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2010. 18 (1): p. 9–15.
- 78 Yuan, C.C., et al.: *Detecting cytokeratin 19 mRNA in the peripheral blood cells of cervical cancer patients and its clinical-pathological correlation*. Gynecol Oncol, 2002. 85 (1): p. 148–153.
- 79 Saloustros, E., et al.: *Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells during follow-up of patients with operable breast cancer: prognostic relevance for late relapse*. Breast Cancer Research, 2011. 13 (3): R60.
- 80 Ignatiadis, M., et al.: *Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer*. Clin Cancer Res, 2008. 14 (9): p. 2593–2600.
- 81 Ignatiadis, M., et al.: *Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. 25 (33): p. 5194–5202.
- 82 Soltani, S., et al.: *The expression of CK-19 gene in circulating tumor cells of blood samples of metastatic breast cancer women*. Res Pharm Sci, 2015. 10 (6): p. 485–496.
- 83 Noack, F., et al.: *A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications*. Int J Biol Markers, 2000. 15 (1): p. 100–104.
- 84 Tunca, B., et al.: *CK19, CK20, EGFR and HER2 status of circulating tumor cells in patients with breast cancer*. Tumori, 2012. 98 (2): p. 243–251.
- 85 Xenidis, N., et al.: *Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2006. 24 (23): p. 3756–3762.
- 86 Zhao, S., et al.: *Circulating tumor cells (CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19, and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients*. Cell Biochem Biophys, 2013. 65 (2): p. 263–273.
- 87 Wu, Y., Zhou, B.P.: *Snail: More than EMT*. Cell Adh Migr, 2010. 4 (2): p. 199–203.
- 88 Barrallo-Gimeno, A., Nieto, M.A.: *Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily*. Trends Genet, 2009. 25 (6): p. 248–252.
- 89 Villarejo, A., et al.: *Differential Role of Snail1 and Snail2 Zinc Fingers in E-cadherin Repression and Epithelial to Mesenchymal Transition\**. J Biol Chem, 2014. 289 (2): p. 930–941.
- 90 Vega, S., et al.: *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev, 2004. 18 (10): p. 1131–1143.
- 91 Peinado, H., et al.: *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. 7 (6): p. 415–428.
- 92 Moody, S.E., et al.: *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. Cancer Cell, 2005. 8 (3): p. 197–209.
- 93 Blanco, M.J., et al.: *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. Oncogene, 2002. 21 (20): p. 3241–3246.
- 94 Nieto, M.A.: *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3 (3): p. 155–166.
- 95 Kajita, M., et al.: *Aberrant Expression of the Transcription Factors Snail and Slug Alters the Response to Genotoxic Stress*. Mol Cell Biol, 2004. 24 (17): p. 7559–7566.
- 96 Hajra, K.M., et al.: *The SLUG Zinc-Finger Protein Represses E-Cadherin in Breast Cancer*. Cancer Res, 2002. 62 (6): p. 1613–1618.

- 97 Esposito, S., et al.: *SNAI2/Slug gene is silenced in prostate cancer and regulates neuroendocrine differentiation, metastasis-suppressor and pluripotency gene expression*. *Oncotarget*, 2015. 6 (19): p. 17121–17134.
- 98 Merikallio, H., et al.: *Slug is associated with poor survival in squamous cell carcinoma of the lung*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. 7 (9): p. 5846–5854.
- 99 Uchikado, Y., et al.: *Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2005. 11 (3): p. 1174–1180.
- 100 Hannenhalli, S., Kaestner, K.H.: *The evolution of Fox genes and their role in development and disease*. *Nat Rev Genet*, 2009. 10 (4): p. 233–240.
- 101 Tuteja, G., Kaestner, K.H.: *SnapShot:Forkhead Transcription Factors I*. *Cell*, 2007. 130 (6): 1160.e1-1160.e2.
- 102 Wang, Y.-W., et al.: *High expression of forkhead box protein C2 is related to poor prognosis in human gliomas*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. 15 (24): p. 10621–10625.
- 103 Li, C., et al.: *Forkhead Box Protein C2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition, Migration and Invasion in Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cell Line (SKOV3/CDDP)*. *Cell Physiol Biochem*, 2016. 39 (3): p. 1098–1110.
- 104 Cui, L., et al.: *FOXC2 is up-regulated in pancreatic ductal adenocarcinoma and promotes the growth and migration of cancer cells*. *Tumour Biol*, 2016. 37 (7): p. 8579–8585.
- 105 Cai, L., et al.: *The relationship between gene expression of Forkhead box C2 and tumor progression in cervical carcinoma*. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2014. 35 (6): p. 625–630.
- 106 Kume, T.: *Foxc2 transcription factor: a newly described regulator of angiogenesis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. 18 (6): p. 224–228.
- 107 Mani, S.A., et al.: *Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104 (24): p. 10069–10074.
- 108 Dai, J., et al.: *Correlation of Forkhead Box c2 with subtypes and invasive ability of invasive breast cancer*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014. 34 (6): p. 896–901.
- 109 Lim, J.C.T., et al.: *Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition proteins Twist and Foxc2 in phyllodes tumours of the breast*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. 150 (1): p. 19–29.
- 110 Tang, H., et al.: *AKT-ions with a TWIST between EMT and MET*. *Oncotarget*, 2016. 7 (38): p. 62767–62777.
- 111 Finlay, J., et al.: *RNA-Based TWIST1 Inhibition via Dendrimer Complex to Reduce Breast Cancer Cell Metastasis*. *Biomed Res Int*, 2015. 2015.
- 112 Kress, W., et al.: *Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome*. *Eur J Hum Genet*, 2006. 14 (1): p. 39–48.
- 113 Yang, J., et al.: *Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis*. *Cell*, 2004. 117 (7): p. 927–939.
- 114 van Doorn, R., et al.: *Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sezary syndrome identified by gene expression analysis*. *Cancer Res*, 2004. 64 (16): p. 5578–5586.
- 115 Liu, A.-n., et al.: *Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer*. *Mol Cell Biochem*, 2012. 367 (1-2): p. 195–203.

- 116 Gomez, I., et al.: *TWIST1 Is Expressed in Colorectal Carcinomas and Predicts Patient Survival*. PLoS One, 2011. 6 (3).
- 117 Watanabe, O., et al.: *Expression of twist and wnt in human breast cancer*. Anticancer Res, 2004. 24 (6): p. 3851–3856.
- 118 Wushou, A., et al.: *Twist-1 Up-Regulation in Carcinoma Correlates to Poor Survival*. Int J Mol Sci, 2014. 15 (12): p. 21621–21630.
- 119 National Center for Biotechnology Information (NCBI): *AKT2 AKT serine/threonine kinase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene*. auf: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/208>, abgerufen am: 04.04.2017.
- 120 Berndt, N., et al.: *Akt2 and acid ceramidase cooperate to induce cell invasion and resistance to apoptosis*. Cell Cycle, 2013. 12 (13): p. 2024–2032.
- 121 Cho, H., et al.: *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)*. Science, 2001. 292 (5522): p. 1728–1731.
- 122 Cheng, G.Z., et al.: *Twist Transcriptionally Up-regulates AKT2 in Breast Cancer Cells Leading to Increased Migration, Invasion, and Resistance to Paclitaxel*. Cancer Res, 2007. 67 (5): p. 1979–1987.
- 123 Arboleda, M.J., et al.: *Overexpression of AKT2/Protein Kinase B $\beta$  Leads to Up-Regulation of  $\beta$ 1 Integrins, Increased Invasion, and Metastasis of Human Breast and Ovarian Cancer Cells*. Cancer Res, 2003. 63 (1): p. 196–206.
- 124 Cheng, J.Q., et al.: *Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93 (8): p. 3636–3641.
- 125 Grille, S.J., et al.: *The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines*. Cancer Res, 2003. 63 (9): p. 2172–2178.
- 126 Kasimir-Bauer, S., et al.: *Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells*. Breast Cancer Res, 2012. 14 (1): R15.
- 127 Aktas, B., et al.: *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Research, 2009. 11 (4): R46.
- 128 Liu, Y., et al.: *ALDH1A1 mRNA expression in association with prognosis of triple-negative breast cancer*. Oncotarget, 2015. 6 (38): p. 41360–41369.
- 129 National Center for Biotechnology Information (NCBI): *ALDH1A1 aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 [Homo sapiens (human)] - Gene*. auf: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/216>, abgerufen am: 05.04.2017.
- 130 Rahadiani, N., et al.: *Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications*. Cancer Sci, 2011. 102 (4): p. 903–908.
- 131 Nishikawa, S., et al.: *Aldehyde dehydrogenase high gastric cancer stem cells are resistant to chemotherapy*. Int J Oncol, 2013. 42 (4): p. 1437–1442.
- 132 Li, T., et al.: *ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome*. Lab Invest, 2010. 90 (2): p. 234–244.
- 133 Jiang, F., et al.: *Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Tumor Stem Cell-Associated Marker in Lung Cancer*. Mol Cancer Res, 2009. 7 (3): p. 330–338.

- 134 Ginestier, C., et al.: *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. 1 (5): p. 555–567.
- 135 Pan, H., et al.: *Aldehyde dehydrogenase 1 expression correlates with the invasion of breast cancer*. Diagn Pathol, 2015. 10.
- 136 Morimoto, K., et al.: *Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression*. Cancer Sci, 2009. 100 (6): p. 1062–1068.
- 137 Liu, Y., et al.: *ALDH1A1 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis*. BMC Cancer, 2014. 14: p. 444.
- 138 Liu, S., et al.: *Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts*. Stem Cell Reports, 2014. 2 (1): p. 78–91.
- 139 Lin, Z., et al.: *In vivo antigen-driven plasmablast enrichment in combination with antigen-specific cell sorting to facilitate the isolation of rare monoclonal antibodies from human B cells*. Nat Protoc, 2014. 9 (7): p. 1563–1577.
- 140 Pfaffl, M.W.: *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. 10 (1): p. 92–95.
- 141 Rodríguez-Lázaro, D.: *Real-time PCR in food science*, 2013.
- 142 Applied Biosystems: *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*.
- 143 Lee, A.V., et al.: *MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years*. J Natl Cancer Inst, 2015. 107 (7).
- 144 American Type Culture Collection (ATCC): *MCF7 (ATCC® HTB-22™)*. auf: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo\\_country=de](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo_country=de), abgerufen am: 06.02.2017.
- 145 American Type Culture Collection (ATCC): *MDA-MB-231 (ATCC® CRM-HTB-26™)*. auf: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRM-HTB-26.aspx#generalinformation>, abgerufen am: 06.02.2017.
- 146 Allard, W.J., et al.: *Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases*. Clin Cancer Res, 2004. 10 (20): p. 6897–6904.
- 147 Kallergi, G., et al.: *Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2011. 13 (3): R59.
- 148 Domagala, W., et al.: *Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction*. Am J Pathol, 1990. 136 (1): p. 219–227.
- 149 Zhang, P., et al.: *ZEB1*. Cell Cycle, 2015. 14 (4): p. 481–487.
- 150 Chaffer, C.L., et al.: *Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity*. Cell, 2013. 154 (1): p. 61–74.
- 151 Rack, B., et al.: *Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 2014. 106 (5).
- 152 Cristofanilli, M., et al.: *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2004. 351 (8): p. 781–791.
- 153 Müller, V., et al.: *AGO Stellungnahme: Nachweis zirkulierender Tumorzellen im Blut bei Patientinnen mit Mammakarzinom*. AGO-Empfehlung, 2013.

- 154 Wit, S. de, et al.: *The detection of EpCAM(+) and EpCAM(-) circulating tumor cells*. Sci Rep, 2015. 5: p. 12270.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Beitrag der EMT zur Tumorprogression [50].....	16
<b>Abbildung 2:</b> Ablauf der EMT [50].....	16
<b>Abbildung 3:</b> Ablauf der PCR: [57] .....	18
<b>Abbildung 4:</b> Mechanismus der Taq-Man-Sonde [60] .....	19
<b>Abbildung 5:</b> Auftrennung der Blutbestandteile mit Hilfe von Histopaque [139] .....	26
<b>Abbildung 6:</b> Plattenbelegung in den Spikingversuchen für die RT-PCR .....	29
<b>Abbildung 7:</b> Plattenbelegung in den Patientenversuchen für die RT-PCR .....	30
<b>Abbildung 8:</b> Temperaturprotokoll der RT-PCR mit dem typischen Ablauf in den 3 Schritten .....	31
<b>Abbildung 9:</b> Typischer Fluoreszenzkurvenverlauf einer RT-PCR [141].....	32
<b>Abbildung 10:</b> RNA-Konzentrationen in den Spikingversuchen.....	42
<b>Abbildung 11:</b> RNA-Ratios in den Spikingversuchen.....	42
<b>Abbildung 12:</b> RQ-Werte von GAPDH .....	44
<b>Abbildung 13:</b> RQ-Werte der RT-PCR im Spiking-Versuch 1 .....	44
<b>Abbildung 14:</b> Vergrößerung des unteren RQ-Bereiches im Rahmen von Versuch 1 .....	45
<b>Abbildung 15:</b> RQ-Werte der RT-PCR im Spiking-Versuch 2 .....	45
<b>Abbildung 16:</b> Amplifikationskurve für CK19 .....	46
<b>Abbildung 17:</b> RQ-Werte von CK19.....	47
<b>Abbildung 18:</b> Amplifikationskurve für Snail .....	47
<b>Abbildung 19:</b> RQ-Werte von Snail .....	48
<b>Abbildung 20:</b> Amplifikationskurve für FoxC2 .....	49
<b>Abbildung 21:</b> RQ-Werte von FoxC2 .....	50
<b>Abbildung 22:</b> Amplifikationskurve für Twist.....	51
<b>Abbildung 23:</b> RQ-Werte von Twist. ....	51
<b>Abbildung 24:</b> Box-Plot-Diagramm der Konzentrationen der Patientenproben und Negativproben. .	53
<b>Abbildung 25:</b> Box-Plot-Diagramm der Ratios der Patienten- und Negativproben.....	54
<b>Abbildung 26:</b> Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Housekeeping-Gens 18s bei 2 nicht detektierten und 109 gemessenen Patientenproben.....	58
<b>Abbildung 27:</b> Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Markergens CK19 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben .....	61
<b>Abbildung 28:</b> Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens CK19 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben. ....	62
<b>Abbildung 29:</b> Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte für das Markergen Snail bei 41 nicht detektierten und 70 gemessenen Patientenproben .....	65

<b>Abbildung 30:</b> Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens Snail bei 41 nicht detektierten und 70 gemessenen Patientenproben. ....	66
<b>Abbildung 31:</b> Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Markergens FoxC2 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben .....	69
<b>Abbildung 32:</b> Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens FoxC2 bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben .....	70
<b>Abbildung 33:</b> Box-Plot-Diagramm der AvgCt-Werte des Markergens Twist bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben .....	73
<b>Abbildung 34:</b> Box-Plot-Diagramm der RQ-Werte des Markergens Twist bei 2 nicht detektierten Proben und 109 gemessenen Patientenproben. ....	74
<b>Abbildung 35:</b> Vergleich der Tumoreigenschaften von Gruppe 1 und Gruppe 2 .....	82

### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> TNM-Klassifikation nach UICC [11] .....	6
<b>Tabelle 2:</b> UICC Stadien des Mammakarzinoms [11] .....	6
<b>Tabelle 3:</b> Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms [11] .....	9
<b>Tabelle 4:</b> Berechnung des Nottingham-Prognose-Index [11] .....	12
<b>Tabelle 5:</b> Patientendaten der G1-Tumore .....	36
<b>Tabelle 6:</b> Patientendaten der G2-Tumore .....	38
<b>Tabelle 7:</b> Patientendaten der G3-Tumore .....	38
<b>Tabelle 8:</b> Patientendaten der metastasierten Tumore .....	39
<b>Tabelle 9:</b> Anzahl der Tumorzellen für das Spiking .....	41
<b>Tabelle 10:</b> Konzentrationen und Ratios der gespiketen RNA-Proben für Versuch 1 und Versuch 2 ..	42
<b>Tabelle 11:</b> Ct-Werte der RT-PCR für 18s in den Spiking Versuchen .....	43
<b>Tabelle 12:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für GAPDH in den Spiking-Versuchen .....	43
<b>Tabelle 13:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für CK19 in den Spiking-Versuchen .....	46
<b>Tabelle 14:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Snail in den Spiking-Versuchen .....	48
<b>Tabelle 15:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Slug in den Spiking-Versuchen .....	49
<b>Tabelle 16:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für FoxC2 in den Spiking-Versuchen .....	50
<b>Tabelle 17:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Twist in den Spiking-Versuchen .....	51
<b>Tabelle 18:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für Akt2 in den Spiking-Versuchen .....	52
<b>Tabelle 19:</b> Ct- und RQ-Werte der RT-PCR für ALDH1 in den Spiking-Versuchen .....	52
<b>Tabelle 20:</b> Konzentrationen in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und Ratios (A260/A280) der 111 Patientenproben .....	57
<b>Tabelle 21:</b> Konzentrationen in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und Ratios (A260/A280) der 14 Negativproben .....	57
<b>Tabelle 22:</b> AvgCt-Werte der RT-PCR für 18s in den Patientenproben .....	61
<b>Tabelle 23:</b> AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für CK19 in den Patientenproben .....	65
<b>Tabelle 24:</b> AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für Snail in den Patientenproben .....	69
<b>Tabelle 25:</b> AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für FoxC2 in den Patientenproben .....	73
<b>Tabelle 26:</b> AvgCt- und RQ-Werte der RT-PCR für Twist in den Patientenproben. ....	76
<b>Tabelle 27:</b> Patientendaten und Werte der relativen Quantifizierung aus Gruppe 1 .....	80
<b>Tabelle 28:</b> Patientendaten und Werte der relativen Quantifizierung aus Gruppe 2 .....	81



## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.G.
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
AvgCt	Average Cycle over Threshold
BET	Brusterhaltende Therapie
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix (Protein)
cDNA	copy DNA
CK19	Zytokeratin 19
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle over Threshold
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCIS	Duktales Carcinoma in Situ
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Disseminierte Tumorzelle
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Östrogenrezeptor
EWGBSP	European Working Group for Breast Screening Pathology
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FoxC2	Forkhead box protein C2
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HER2	Human epidermal growth factor 2
LCIS	Lobuläres Carcinoma in Situ
LN (LIN)	Lobuläre Neoplasie

MEM	Modified Eagle Medium
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MRD	Minimale Resterkrankung
MRM	Modifizierte radikale Mastektomie
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC1	Mucin 1
NST	Invasive carcinoma of no special type
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3-K	Phosphoinositide 3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RQ	Relative Quantifizierung
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
SCS	Sarthre-Chotzen-Syndrom
TGFβ	Transforming growth factor beta
TNBC	Triple-negative breast cancer
UICC	Union internationale contre le cancer
Undet.	Undetermined

## 6.5 Material und Geräte

### Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
<b>Hautdesinfektionsmittel</b> <b>250 ml</b>	Octeniderm® farblos Art.-Nr.: 118211	Schülke & Mayr GmbH Norderstedt, Deutschland
<b>PBS-Lösung</b> <b>1000 ml</b>	Phosphate Bufferd Saline Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup> Cat.-No.: L 1820	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
<b>Histopaque</b> <b>500 ml</b>	HISTOPAQUE®-1077 sterile- filtered, density: 1.077 g/ml Produktnummer: 10771	Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA
<b>Trizol-Lösung</b> <b>20 ml</b>	TRIzol® Reagent Cat.-No.: 15596-018	Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Chloroform-Reagenz</b> <b>200 ml</b>	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Chloroform for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
<b>Isopropanol</b>	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur 2-Propanol for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
<b>Ethanol</b>	EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur Ethanol absolut for analysis	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
<b>RNAse freies H<sub>2</sub>O</b> <b>1000 ml</b>	Aqua ad iniectabilia, Wasser für Injektionszwecke	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
<b>Primer zur Umschreibung in cDNA (Oligo-dTs)</b> <b>50 µl</b>	SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Cat.-No.: 18080-400 Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 µM)	Invitrogen by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Puffer zur Umschreibung in cDNA</b> <b>50 µl</b>	SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Cat.-No.: 18080-400 Annealing Puffer	Invitrogen by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Reaction Mix zur Umschreibung in cDNA</b> <b>500 µl</b>	SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Cat.-No.: 18080-400 2X First-Strand Reaction Mix (contains 10 mM MgCl <sub>2</sub> and 1 mM each dNTP)	Invitrogen by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Enzyme Mix zur Umschreibung in cDNA</b> <b>100 µl</b>	SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Cat.-No.: 18080-400 SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	Invitrogen by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA

<b>MasterMix</b>	TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) 250 reactions	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer 18s</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS03003631_g1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer GAPDH</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS02786624_g1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer CK19</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS00761767_s1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer Snail (SNAI1)</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS00195591_m1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer Slug (SNAI2)</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS00161904_m1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer FoxC2</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS00270951_s1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer TWIST</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS01675818_s1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer Akt2</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS01086099_m1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Primer ALDH1a2</b> <b>250 µl</b>	TaqMan® Gene Expression Assay HS00180254_m1	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Zelllinie MCF7</b>	MCF7 (ATCC® HTB-22™), adenocarcinoma mammary gland	American Type Culture Collection (ATCC®) Wesel, Deutschland
<b>Zelllinie MDA-MB-231</b>	MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), adenocarcinoma mammary gland	American Type Culture Collection (ATCC®) Wesel, Deutschland
<b>Zellkultur-Medium</b> <b>1000 ml</b>	Dulbecco's MEM with stable glutamine, low endotoxin with 3.7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , with 4.5 g/l D-Glucose Cat.-No.: FG0445	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland

<b>Fetal Bovine Serum</b> <b>500 ml</b>	FETAL BOVINE SERUM Cat.-No.: S0115	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland
<b>Penicillin/Streptomycin</b> <b>5 ml</b>	Penicillin/Streptomycin, lyophilisiert, 100x 10.000U / ml/10.000µg/ml Cat.-No.: A2210	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland
<b>Trypsin/EDTA-Lösung</b> <b>100 ml</b>	Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup> Cat.-No.: L2143	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland
<b>Dimethyl Sulfoxid</b>	Dimethyl Sulfoxide anhydrous, ≥ 99.9% Prod.-No.: 276855	Sigma Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA
<b>Trypan-Blau</b> <b>20 ml</b>	Trypan Blue Solution 0,4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA

Verbrauchsmaterial:

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>EDTA Blutentnahmeröhrchen 10 ml</b>	BD Vacutainer® EDTA Röhrchen K <sub>2</sub> EDTA (1,8 mg/dl) (16x100 mm) Art.-No.: 367525	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>Flügelkanüle</b>	BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set (0,8x19x305mm) Art.-No.: 367286	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>Einmalhalter (Blister)</b>	BD Vacutainer® Holders Art.-No.: 364815	Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>FALCON-Röhrchen 15 ml</b>	CELLSTAR® TUBES, PP, 17/120 mm, conical bottom, blue screw cap, sterile Cat.-No.: 188261	Greiner Bio-One AG Kremsmünster, Österreich
<b>FALCON-Röhrchen 50 ml</b>	CELLSTAR® TUBES, PP, 30/115 mm, conical bottom, blue screw cap, sterile Cat.-No.: 227261	Greiner Bio-One AG Kremsmünster, Österreich
<b>RNAse freies Tube 1,5 ml/ 1,7 ml 1000 Stück</b>	Mµliti®-SafeSeal® Tubes, farblos, PP, Füllvolumen/Nennvolumen 1,5/1,7 ml Art.-No.: 7080.1	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
<b>Pipettenspitzen 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl</b>	SafeSeal® SurPhob Filterspitzen 10 µl/ 100 µl/ 1000 µl	Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>PCR-Platte 20 Stück</b>	MicroAmp™ Fast Optical 96- Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 ml Cat.-No.: 4346906	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>PCR-Abdeckfolie 100 Stück</b>	MicroAmp™ Optical Adhesive Film Cat.-No.: 4311971	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup></b>	Advanced TC™ CELLSTAR® Zellkulturflasche, 75 cm <sup>2</sup> , steril Cat.-No.: 658970	Greiner Bio-One AG Kremsmünster, Österreich

<b>Pipettenspitzen</b> <b>5 ml/ 10 ml</b>	FALCON® 5 ml/ 10 ml Serological Pipet, Polystyrene, 0.1 Increments, sterile, individually wrapped	Corning Life Sciences Corning, New York, USA
<b>Cryoröhrchen</b> <b>1,5 ml</b>	ThermoScientific™ Nalgene™ Cryo Vial, 1,5 ml, sterile	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA
<b>Neubauer Zählkammer mit</b> <b>Deckglas</b> <b>0,100 mm Tiefe</b>	Neubauer improved Zählkammer mit aufgelegtem Glas, Kammertiefe 0,1 mm	LO Laboroptik GmbH Friedrichsdorf, Deutschland

Geräteliste:

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
<b>Tischzentrifuge</b>	Multifuge 3 SR+/3L-R	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA
<b>Minizentrifuge</b>	Centrifuge 5415	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
<b>Vakuumzentrifuge</b>	Concentrator 5301	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
<b>Vortexmischer</b>	IKA® MS1 Minishaker	Sigma Aldrich Corporation St. Louis, Missouri, USA
<b>Gefrierschrank -20°C</b>	Bosch Cooler	Robert Bosch GmbH Gerlingen, Deutschland
<b>Gefrierschrank -80°C</b>	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation Waltham, Massachusetts, USA
<b>Photometer</b>	Nanodrop	Implen München, Deutschland
<b>Heizblock</b>	Thermomixer comfort	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	Thermo Scientific HeraCell 150i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA
<b>Sicherheitswerkbank</b>	HeraSafe, Heraeus Instruments	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA
<b>Real-Time-PCR-Gerät</b>	7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems® by Life Technologies Corporation Carlsbad, California, USA
<b>Mikroskop</b>	DIAVERT Inverted Microscope	Ernst Leitz GmbH Wetzlar, Deutschland
<b>Elektrische Pipettierhilfe</b>	Pipetus® Standard, motoric pipette filler for measuring, volumetric and Pasteur pipettes	Hirschmann Laborgeräte GmbH + Co. KG Eberstadt, Deutschland



## 6.6 Ethikantrag

	LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN	ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN	
Ethikkommission (Präsenzkomm.) 8 - 80336 München		Vorsitzender: Prof. Dr. W. Eisenmenger Telefon+49 (0)89 5160 - 5191 Telefax+49 (0)89 5160 - 5192 Ethikkommission@med.uni-muenchen.de  <a href="http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de">www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de</a>  Postanschrift: Pettenkoferstr. 8a D-80336 München  Hausanschrift: Pettenkoferstr. 8 D-80336 München München, 10.05.2012 EM/Jec	
Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde Maistr. 11 80337 München			
<b>Titel:</b> <b>Antragsteller:</b> <b>Projekt- Nr.</b>	<b>Krebsfrüherkennung bei gynäkologischen Tumoren</b> <b>Prof. Dr. U. Jeschke, Dr. U. Andergassen</b> <b>148-12</b>		
<p>Sehr geehrter Herr Kollege Jeschke,          sehr geehrter Herr Kollege Andergassen,</p> <p>besten Dank für Ihr Schreiben vom 06.05.2012 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK- Antrag, Patienten- Information u. – Einverständniserklärung).</p> <p>Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.</p> <p>Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.</p> <p>Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.</p> <p>Mit freundlichen Grüßen</p> <p>          Prof. Dr. W. Eisenmenger          Vorsitzender der Ethikkommission</p> <p>Nr Mitglieder der Ethikkommission</p> <p>P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien für Anträge an die Ethikkommission.          Internetadresse: <a href="http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de">www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de</a></p>			

Mitglieder der Kommission:  
 Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Hild (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. G. Baumgartner (stellv. Vorsitzender), PD Dr. Th. Becht, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kurze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Pasching, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfister, Dr. Ch. Zach

## Poster und Veröffentlichung

- Andergassen U., Schlenk K., Jeschke U., Sommer H., Kölbl A.

**Epithelial-mesenchymal transition was identified as a potential marker for breast cancer aggressiveness using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction**

Mol Med Rep., 2017 Nov, DOI: 10.3892/mm r.2018.9091

## Eidesstattliche Erklärung

***Kristina Schlenk***

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Real-Time-PCR basierter Nachweis zirkulierender Tumorzellen (CTCs) aus dem peripheren Blut von Brustkrebspatientinnen mit Hilfe von EMT-Markergenen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 24.07.2018

Kristina Schlenk

## Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler verschiedener Personen nicht möglich gewesen, daher möchte ich Ihnen an dieser Stelle gerne danken.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Udo Jeschke für die Möglichkeit der Promotion und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit danken.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Privatdozent Dr. Dr. Ulrich Andergassen für die Überlassung des Themas meiner Dissertation. Durch seine wissenschaftliche Expertise und seine umfangreiche klinische Erfahrung auf dem Gebiet der gynäkologischen Onkologie, hatte ich hervorragende Unterstützung. Bei Problemen im Rahmen der Interpretation, stand er mir stets helfend zur Seite. Meinen außerordentlichen Dank für diese hervorragende Betreuung.

Meinen uneingeschränkten Dank an Frau Dr. Alexandra Kölbl. Als geduldige Betreuerin brachte sie mir die Laborarbeit bei, hat mich mit Rat und Tat bei meinen Versuchen unterstützt und bei diversen Problemen im Laufe meiner Promotion geholfen. Trotz genug eigener Arbeit hatte sie immer ein offenes Ohr für mich und einen Blick für meine Ergebnisse. Auch nach Beendigung der Laborarbeit stand sie mir bei der Ergebnisauswertung und Dateninterpretation stets mit konstruktiver Kritik zur Seite. Vielen Dank für die Geduld, das gespendete Blut und die allumfassende Unterstützung.

Auch möchte ich den Mitarbeiterinnen des tumorimmunologischen Labors, insbesondere Frau Leonie Majunke, Frau Beate Zill und Frau Alvera Rengel-Puertas für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken. Ich fühlte mich vom ersten Tag an gut in dem Labor aufgehoben, da stets jemand ein offenes Ohr für mich hatte.

Besonders möchte ich auch all den Frauen danken, die sich als gesunde Probandinnen zur Verfügung gestellt haben. Ohne euch wären Teile dieser Dissertation nie möglich gewesen. Vielen Dank an Alex, Angelika, Annika, Sarah, Bettina, Eva-Maria, Susa, Franzi, Miri, Dagmar, Stubsi, Elke, Steffi, Katharina, Kathi, Jenny, Theresa, Vanessa und Annegret.

Danken möchte ich auch meinem Bruder Christopher und meiner guten Freundin Angelika für die hilfreichen Tipps zum Schreiben dieser Arbeit und ihre Verbesserungen, sowie die Unterstützung im Rahmen der graphischen Ausgestaltung.

Nicht zuletzt möchte ich Daniel für seine moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums sowie im Rahmen dieser Dissertation danken. Vielen Dank für deine immerwährende Unterstützung und Ermunterung, sowie das geduldige Ertragen des Chaos auf deinem Schreibtisch. Ohne dich, wäre es viel schwerer geworden.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen beiden Eltern, die mir immer unterstützend zur Seite stehen. Ohne ihren Rückhalt und ihre Unterstützung zu jeder Zeit wäre all das nicht möglich gewesen. Danke!